

Université de Montréal

**Identification des partenaires protéiques de l'hélicase virale E1 du virus du
papillome humain : caractérisation d'une nouvelle interaction avec la
protéine à domaines WD p80**

Par
Alexandra Côté-Martin

Département de biochimie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en biochimie
option virologie moléculaire

avril, 2007

©, Alexandra Côté-Martin, 2007



W

H

US8

2007 .

V-122

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Identification des partenaires protéiques de l'hélicase virale E1 du virus du papillome
humain : caractérisation d'une nouvelle interaction avec la
protéine à domaines WD p80

Présenté par :

Alexandra Côté-Martin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr M. Raymond

Président-rapporteur

Dr J. Archambault

Directeur de recherche

Dr B. Coulombe

Codirecteur

Dr F. Coutlée

Membre du jury

RÉSUMÉ

Les virus du papillome humain (HPV) sont de petits virus à ADN double brins qui infectent les épithéliums stratifiés de la peau et des muqueuses. Étant donné la capacité codante limitée de leur petit génome, l'achèvement du cycle de réplication viral dépend en grande partie de la machinerie cellulaire. Ainsi, la majorité des protéines virales, incluant l'hélicase E1, établissent de multiples interactions avec les protéines de la cellule hôte. Considérant la présence de séquences conservées chez E1 pour lesquelles aucune fonction n'est associée à ce jour, on a utilisé une approche de double chromatographie d'affinité couplée à la spectrométrie de masse afin d'identifier de nouveaux partenaires de l'hélicase virale E1. Cette approche a mené à l'identification d'une nouvelle interaction entre les 40 premiers acides aminés de HPV11 E1 et la protéine à domaines WD p80, une interaction qui est conservée et exclusive aux HPV infectant les muqueuses. Les études de co-localisation cellulaire ont montré que p80 est relocalisé du cytoplasme au noyau dépendamment de son interaction avec E1. Trois doubles substitutions dans E1 inhibant la liaison avec p80 ont été identifiées et subséquemment utilisées pour des études fonctionnelles. Ces dernières révèlent que, bien que l'interaction avec p80 ne soit pas requise pour l'amplification du génome suivant la différenciation des kératinocytes, elle est impliquée dans le contrôle du nombre de copies d'épisomes viraux dans les couches cellulaires basales.

Mots clés : Papillomavirus, E1, hélicase, réplication, WDR48, p80, interactions protéiques

ABSTRACT

Due to the limited coding capacity of their small genome, human papillomaviruses (HPV) rely extensively on host factors for completion of their life cycle. Accordingly, most HPV proteins, including the replicative helicase E1, engage in multiple protein interactions. The fact that conserved regions of E1 have not yet been ascribed a function prompted us to use tandem affinity purification (TAP) coupled to mass spectrometry to identify novel targets of this helicase. This led to the discovery of a novel interaction between the N-terminal 40 amino acids of HPV11 E1 and the cellular WD repeat protein p80 (WDR48). We found that interaction with p80 is conserved among E1 from anogenital HPV but not cutaneous or animal types. Co-localization studies showed that E1 can redistribute p80 from the cytoplasm to the nucleus. Three amino acid substitutions in E1 from HPV types 11 and 31 were identified that abrogate binding to p80 and its re-localization to the nucleus. HPV31 genome containing these E1 mutations were maintained in episomal form in primary human keratinocytes but at copy numbers 50-80% lower than that of the wild type genome. All three mutant episomes could be amplified upon methylcellulose-induced cellular differentiation. These findings suggest a role for p80 in maintaining an optimal copy number of the viral episome during the early phase of infection.

Keywords: Papillomavirus, helicase, E1, replication, protein-protein interaction, WDR48, p80, protein purification, TAP.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	iv
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	ix
 CHAPITRE I : Introduction et revue de la littérature	 1
1. Introduction aux papillomavirus	1
1.1. Infections à papillomavirus	1
1.2. Classification	2
2. Biologie moléculaire des papillomavirus	5
2.1. Structure du génome	5
2.1.1. La longue région contrôle	6
2.1.2. Les protéines virales	8
2.1.2.1. Les oncogènes E5, E6 et E7	8
2.1.2.2. La protéine réplicatrice E1	11
2.1.2.3. La protéine multifonctionnelle E2	12
2.1.2.4. La protéine E1 ^{E4}	14
2.1.2.5. Les protéines tardives L1 et L2	14
3. Cycle réplcatif viral	16
3.1. Cycle réplcatif au sein de l'épithélium stratifié	16
3.1.1. Régulation de l'expression des protéines	19
3.2. Cycle réplcatif au sein de la cellule	22
3.2.1. Entrée et décapsidation	22
3.2.2. Réplication du génome viral	23
3.2.2.1. Régulation de la réplication du génome viral	24
3.2.3. Assemblage et sortie	26
3.3. Systèmes d'études biologiques	26
4. Initiation de la réplication	29
4.1. Initiation de la réplication chez les eucaryotes	29
4.2. Protéines initiatrices virales	30
4.2.1. L'hélicase virale E1	32
4.2.1.1. Classification	32
4.2.1.2. Structure et fonctions	33
4.2.1.3. Régulation d'E1 par des modifications post-traductionnelles	37
4.2.1.4. Mécanismes biochimiques d'initiation de la réplication	38
4.2.1.4.1. Liaison à l'origine de réplication	38
4.2.1.4.2. Déroulement de l'ADN	41

4.2.1.5. Les partenaires d'interaction d'E1	43
5. Identification de partenaires protéiques	45
5.1. Méthodes par criblage de banques d'ADN complémentaires (ADNc)	45
5.1.1. La librairie de phages	46
5.1.2. Les systèmes deux-hybrides	46
5.1.3. La complémentation de fragments protéiques	47
5.2. Purification de complexes protéiques	48
6. Hypothèse et objectif	53

CHAPITRE II : Article

Accord des coauteurs	54
Contribution des auteurs à l'article	56
Abstract	59
Introduction	59
Materials and methods	63
Results	69
Discussion	77
References	82
Figure legends	87
Figures	89

CHAPITRE III : Discussion

1. Identification des partenaires cellulaires de l'hélicase virale E1	98
1.1. Purification des complexes protéiques contenant E1	98
1.2. Protéines cellulaires identifiées	99
1.3. Perspectives	101
1.3.1. Composition des complexes protéiques associés à E1 sur l'ADN ...	101
1.3.2. Protéines cellulaires interagissant avec le domaine N-terminal d'E1	102
1.3.3. Étude du rôle de la méthylation du domaine N-terminal d'E1	103
2. Identification d'une nouvelle interaction entre HPV E1 et la protéine cellulaire p80	104
2.1. Caractérisation de l'interaction entre E1 et p80	104
2.2. Impact physiologique de l'interaction entre E1 et p80	105
2.2.1. Impact de l'interaction sur les fonctions répliquatives d'E1	105
2.2.2. Mise en contexte de l'interaction dans le cycle viral	106
2.3. Perspectives	108
2.3.1. Effet de p80 sur la stabilité d'E1 et la réplication du génome viral ..	108
2.3.2. Élucider la fonction cellulaire de p80	109

CONCLUSION	112
------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE	114
---------------------	-----

ANNEXES

Annexe 1 : Alignement des séquences protéiques de p80 de diverses espèces animales	xi
--	----

Annexe 2 : Identification de TPR en tant que partenaire potentiel de CRPV E1	xiii
--	------

Annexe 3 : Effet de l'abrogation de l'interaction entre E1 et p80 sur l'accumulation cellulaire d'E1	xiv
--	-----

Annexe 4 : Identification d'une interaction potentielle entre DDX1 et HPV11 E1 ...	xv
--	----

LISTE DES FIGURES

Introduction et revue de la littérature

Figure 1 :	Classification phylogénique des papillomavirus basée sur les protéines E1 et E2	4
Figure 2 :	Organisation du génome viral de HPV31	6
Figure 3 :	Organisation de la longue région contrôle des HPV génitaux	8
Figure 4 :	Schéma de la capside virale des papillomavirus	15
Figure 5 :	Cycle réplcatif viral au sein de l'épithélium en différenciation	18
Figure 6 :	Carte des transcrits d'HPV31	21
Figure 7 :	Organisation de l'origine de réplication virale	24
Figure 8 :	Schéma de la fourche de réplication chez les eucaryotes	31
Figure 9 :	Comparaison des protéines initiatrices eucaryotes et virales	32
Figure 10 :	Structure du domaine C-terminal d'E1	34
Figure 11 :	Schéma des domaines fonctionnels d'HPV11 E1	36
Figure 12 :	Structure cristallographique d'un dimère de DBD d'E1 sur l'origine de réplication	39
Figure 13 :	Positionnement d'un tétramère d'E1 sur l'origine de réplication	40
Figure 14 :	Mécanisme de déroulement de l'ADN par E1	42
Figure 15 :	Purification de complexes protéiques par double chromatographie d'affinité	52

Article

Figure 1 :	Identification of cellular proteins that interact with HPV11 E1	89
Figure 2 :	p80 interacts with HPV11 E1 in co-immunoprecipitation assays	90
Figure 3 :	Intracellular localization of p80 and HPV11 E1 in COS-7 cells	91
Figure 4 :	Mapping of a p80 binding domain on E1 and interaction of p80 with E1 from different papillomaviruses	93
Figure 5 :	Amino acid substitutions in HPV11 E1 that abrogate its interaction with p80	94
Figure 6 :	Mutant E1 proteins fail to re-localize p80 from the cytoplasm to the nucleus	95
Figure 7 :	HPV31 E1 proteins defective for p80 interaction	96
Figure 8 :	Maintenance and amplification of mutant HPV31 genomes in primary human keratinocytes	97

Discussion

Figure 16 :	Structure de la protéine p80	100
-------------	------------------------------------	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAA+ :	ATPases associées à des activités cellulaires variées
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ADNdb :	ADN double brins
ADNsb :	ADN simple brin
AgT :	antigène grand T
APC/C :	« anaphase promoting complex/cyclosome »
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ARNt :	ARN de transfert
ATP :	adénosine triphosphate
BPV :	papillomavirus bovin
Brd4 :	« bromodomain-containing protein 4 »
CBM :	motif de liaison aux cyclines
Cdk2 :	« cyclin-dependant kinase 2 » ou kinase 2 dépendante des cyclines
CDP :	« CCAAT displacement protein »
CRPV :	papillomavirus du lapin (« cotton-tailed rabbit PV »)
DBD :	« DNA binding domain » ou domaine de liaison à l'ADN
DHFR :	dihydrofolate réductase
fMTX :	méthotrexate conjugué à la fluorescéine
GST :	glutathionne-S-transférase
HDAC :	déacétylases d'histones
HPV :	papillomavirus humain
HPVx :	HPV de type x
IgG :	immunoglobuline de type G
LCR :	« long control region » ou longue région contrôle
MCM :	mini-chromosome maintenance protein
MS :	« mass spectrometry » ou spectrométrie de masse
NTP :	nucléoside triphosphate
ORC :	complexe de reconnaissance de l'origine
Ori :	origine de réplication virale
p80 :	protéine à domaines WD p80
Pb :	paires de bases
PCA :	complémentation de fragments protéiques
PCNA :	« proliferating cell nuclear antigen »
PML :	« promyelocytic leukemia protein »
Pol α :	polymérase α
PolyA :	polyadénylation
pRB :	protéine du rétinoblastome

pré-RC : complexe de pré-réplication
PV : papillomavirus
RFC : « replication factor C »
RPA : « replication protein A »
SEN : séquence d'export nucléaire
SF3 : superfamille d'hélicases 3
siRNA : « small interfering RNA » ou ARN interférent
SLN : séquence de localisation nucléaire
TAP : « tandem affinity purification » ou purification par double
chromatographie d'affinité
TEV : « tobacco etch virus »
topo : topoisomérase
TPR : « translocated promoter region »
Ubr2 : ubiquitine ligase E3 alpha-II

CHAPITRE I : Introduction et revue de la littérature

1. INTRODUCTION AUX PAPILLOMAVIRUS

1.1. Infections à papillomavirus

Les papillomavirus (PV) sont une famille diversifiée de virus infectant les épithéliums stratifiés squameux chez la plupart des mammifères et des oiseaux. Les PV regroupent de nombreux types dont plus d'une centaine infectent l'homme. Le nom papillomavirus provient du latin *papilla* et réfère à projection/bouton, et du grec *oma* qui signifie tumeur, les infections à PV causant fréquemment une hyperprolifération bénigne au niveau de la peau, communément appelé verrue. Les PV ont un tropisme spécifique pour les kératinocytes, mais selon les différents types, ils infectent préférentiellement soit l'épithélium de la peau, soit celui des muqueuses des voies respiratoires et anogénitales. Chez les PV humains (HPV) infectant les muqueuses, on distingue également les divers types selon leur risque d'oncogenèse. Les HPV à faible risque d'oncogenèse, dont font partie les types 6 et 11, induisent une hyperprolifération bénigne des cellules épithéliales se manifestant par les condylomes (verrues génitales). Les HPV à hauts risques, qui incluent les types 16, 18 et 31, causent quant à eux des lésions pouvant progresser vers la malignité.

Les types cutanés tel HPV1 (HPV de type 1) sont la cause des verrues qui sont fréquemment observées au niveau des mains et des pieds. Les nouveaux virions étant produits au niveau des couches les plus superficielles de la peau, les squames contiennent des virions infectieux. Ces virus se propagent donc suite au détachement des squames infectieux qui peuvent alors transmettre l'infection par contact cutané direct ou encore via l'environnement ou des objets contaminés. Les infections à HPV sont également associées à d'autres pathologies de la peau, tel l'épidermodysplasie verruciforme.

Les HPV qui infectent les muqueuses génitales sont transmis lors de relations sexuelles avec un partenaire infecté. De ce fait, les HPV sont parmi les infections transmises sexuellement les plus répandues. Santé Canada estime qu'environ 75 % des canadiens contractent une infection à HPV au cours de leur vie, tous les types confondus. De plus, les plus récentes études révèlent une prévalence de 26,8 % chez les femmes américaines âgées entre 14-59 ans (57). Les infections par HPV sont généralement asymptomatiques et transitoires : 70-90% des infections régressent spontanément à l'intérieur de 2 ans (56, 75). Les manifestations cliniques d'une infection avec un HPV à faible risque, les types 6 et 11 étant les plus communs, sont les verrues anogénitales, mais ils causent également la papillomatose respiratoire récurrente, une maladie rare dont la forme juvénile est transmise à l'enfant lors de la naissance. Les types oncogéniques, dont le plus répandu est HPV16, sont associés aux néoplasies intraépithéliales et au développement de cancers génitaux et du système respiratoire supérieur. Une étude multinationale dirigée par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) a révélé que l'ADN d'HPV de types oncogéniques est présent dans 99,7% des échantillons de cancers du col utérin (244). Les évidences épidémiologiques permettent d'affirmer que les HPV causent le cancer du col. Ils en sont d'ailleurs une cause essentielle mais non suffisante, des cofacteurs étant également impliqués dans la carcinogénèse (162). Les infections à HPV constituent ainsi un enjeu majeur en santé publique, le cancer du col étant notamment parmi les cancers les plus fréquents chez les femmes mondialement.

1.2. Classification

Historiquement, les PV et les polyomavirus (dont fait partie le virus simien SV40) faisaient conjointement partie de la famille des papovavirus. Cette classification reposait sur certaines similarités du point de vue structural et biologique, soit des petits virus possédant une capsidie icosaédrique non-enveloppée, un génome circulaire d'ADN double brins (ADNdb), et dont les étapes de réplication du génome viral et d'assemblage des nouveaux virions ont lieu au noyau. Par la suite,

les analyses biomoléculaires ont révélées des différences majeures au niveau de leur organisation génomique et désormais, les PV forment une famille distincte, les *papillomaviridae* (32).

La classification communément acceptée des divers types de PV est basée sur la variation génétique au niveau de la séquence codant la protéine virale L1, une variation de plus de 10% définissant un type différent, une différence de 2-10% un sous-type et une variation de moins de 2 % constituant un variant (41). Cependant, certaines évidences semblent indiquer une discontinuité dans l'évolution des gènes L1 et L2 de certains PV, rendant le gène L1 moins approprié aux relations phylogéniques. Récemment, une nouvelle classification basée sur les séquences protéiques d'E1 et E2, qui sont relativement bien conservées entre les PV, a donc été réalisée pour compléter l'ancienne et a permis un meilleur regroupement des PV en concordance avec leurs propriétés biologiques (17), notamment concernant leur tropisme pour la peau ou les muqueuses et leur degré de carcinogénicité. C'est donc cette récente classification qui est présentée.

La famille des *papillomaviridae* est divisée en deux sous-familles : les PV aviaires et les PV de mammifères. Ces derniers peuvent par la suite être classés en 7 super-genres désignés par les lettres A à E (figure 1, p. 4). Le super-genre A englobe deux genres (genres 1 et 2), dont plus particulièrement le premier comprend 4 sous-genres, définis de « a » à « d ». Le groupe « a » comprend tous les HPV à haut risque d'oncogenèse alors que le groupe « b » regroupe les HPV infectant les muqueuses génitales et causant des lésions de bas grade et des condylomes. Finalement, les HPV responsables des lésions cutanées sont retrouvés dans le sous-genre « c » (figure 1, p. 4) (17). Les différentes pathologies discutées dans cette section sont donc dues aux infections par des HPV du super-genre A, et les prochaines sections concerneront donc principalement ce groupe évolutif, et plus particulièrement les types génitaux des sous-genres « a » et « b ».

Figure 1 : Classification phylogénique des papillomavirus basée sur les protéines E1 et E2. (D'après Bravo et Alonso (2006), Virus Genes (17))

2. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DES PAPILLOMAVIRUS

2.1. Structure du génome

Les PV possèdent un petit génome circulaire d'ADNdb codant pour environ 8 protéines : 6-7 protéines précoces (désignées par la lettre E pour « early ») et deux protéines tardives (nommées par la lettre L pour « late »). Communément, tous les HPV encodent les protéines précoces E1, E2, E4, E5, E6 et E7. Une possibilité de cadre de lecture a également été attribuée pour E3 et E8, dont seule l'expression d'E8 (en fusion avec une partie d'E2) a été confirmée. Les différentes séquences codantes virales sont transcrites à partir d'un seul brin du génome viral sous forme d'ARN messagers (ARNm) polycistroniques. Les transcrits sont initiés principalement au niveau de deux ou trois promoteurs majeurs selon les types. En amont de la séquence d'E6 se situe le promoteur précoce qui est utilisé en début d'infection mais également tout au long du cycle réplcatif viral (176) et qui assure la production des protéines précoces. Les protéines structurales synthétisées dans les dernières étapes du cycle réplcatif sont sous le contrôle du promoteur tardif situé dans la séquence codante d'E7. Celui-ci est activé seulement dans les dernières étapes du cycle réplcatif de manière dépendante à la différenciation des kératinocytes (121). Sommairement, le génome peut être divisé en trois parties : une section contenant les protéines précoces, la seconde les protéines tardives et une section régulatrice. Cette troisième région, qui couvre 800-1000 paires de bases (pb) n'encode aucune protéine virale et contribue à la régulation de la réplcation et de la transcription des ARNm viraux précoces par la liaison de nombreux facteurs cellulaires et du facteur viral E2, d'où son nom de « longue région contrôle » (LCR ou « long control region », aussi nommée URR pour « upstream regulatory region ») (figure 2, p. 6).

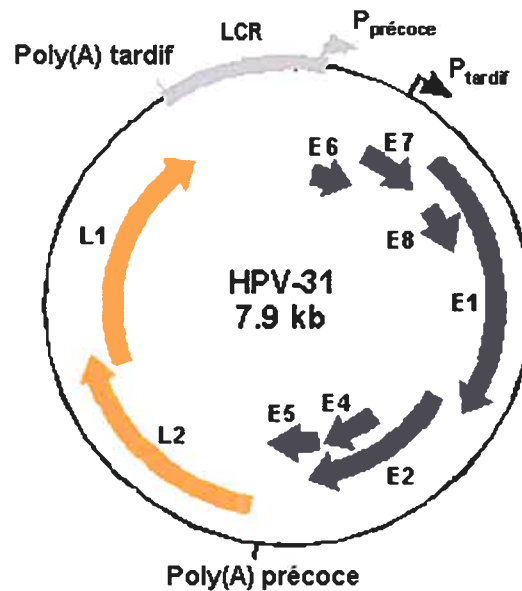


Figure 2 : Organisation du génome viral du HPV31. Le génome viral peut être sommairement divisé en trois parties. La première moitié du génome encode les protéines précoces, dont les transcrits sont initiés au promoteur précoce. La seconde partie encode les deux protéines tardives de la capside, produites dans les kératinocytes différenciés où le promoteur tardif est alors actif. La troisième partie (LCR), qui s'étend sur environ 800-1000 pb, est non codante et possède des sites de liaison pour plusieurs facteurs cellulaires et viraux contrôlant l'expression des gènes viraux précoces. (D'après Laimins laboratory web site, (page consultée le 20 mars 2007), [en ligne], adresse URL : http://bugs.mimnet.northwestern.edu/laimins_lab/labsite/Research.html2005).

2.1.1. La longue région contrôle (LCR)

Chez les HPV génitaux, cette région peut être sous-divisée en 3 sections. Tout d'abord, s'étendant sur approximativement 300 pb, la région 5' de la LCR est délimitée par la fin du cadre de lecture de L1 et le site de liaison d'E2 le plus distal du promoteur précoce majeur (figure 3, p. 8). Elle ne semble pas nécessaire à la réplication virale ni à l'amplification du génome (102). Elle contient la séquence de polyadénylation (polyA) des transcrits tardifs et elle jouerait plutôt un rôle dans la

terminaison des transcrits tardifs. Au niveau de l'ARN, cette région pourrait également être impliquée dans la stabilité des transcrits tardifs.

Avoisinant la région 5' et encadrée par deux sites de liaison d'E2 (#3 et #4) se situe la région activatrice de la transcription, siège de plusieurs sites de liaison pour divers facteurs de transcription cellulaires tels AP-1 et Oct-1 (96, 173). Les différents facteurs variant en fonction du stade de différenciation cellulaire, ils permettent la modulation de l'expression des gènes viraux au cours du cycle réplcatif (248). Cette portion est également impliquée dans le tropisme des PV. En effet, alors que la réplication est possible dans différents types cellulaires, la transcription des gènes viraux est restreinte aux kératinocytes (13, 85). La réplication des PV serait donc notamment limitée par la transcription des gènes viraux qui semble ainsi dépendre d'une combinaison complexe de facteurs de transcription retrouvée dans les kératinocytes et liant cette portion de la LCR. Pour cette raison, cette région est également nommée « élément activateur spécifique aux kératinocytes » (KE pour « keratinocyte enhancer ») (21, 44, 85).

Bordée par le site de liaison d'E2 #3 et la séquence d'E6, la région 3' de la LCR est l'origine de réplication virale (ori) (figure 3, p. 8). Cette portion d'environ 90-140 pb est suffisante pour permettre la réplication en présence des deux protéines de réplication virales : E1 et E2 (28, 76). Cette section contient également plusieurs sites pour la liaison de divers facteurs de transcription cellulaires, notamment le facteur initiateur de la transcription TFIID qui lie la boîte TATA. C'est donc à ce niveau que sont initiés les transcrits précoces. Aussi, conformément à son implication dans la réplication du génome viral, elle contient les sites d'E1 et E2 à raison de quatre sites d'E1 flanqués de trois sites pour la liaison d'E2 (186) (figure 3, p. 8).

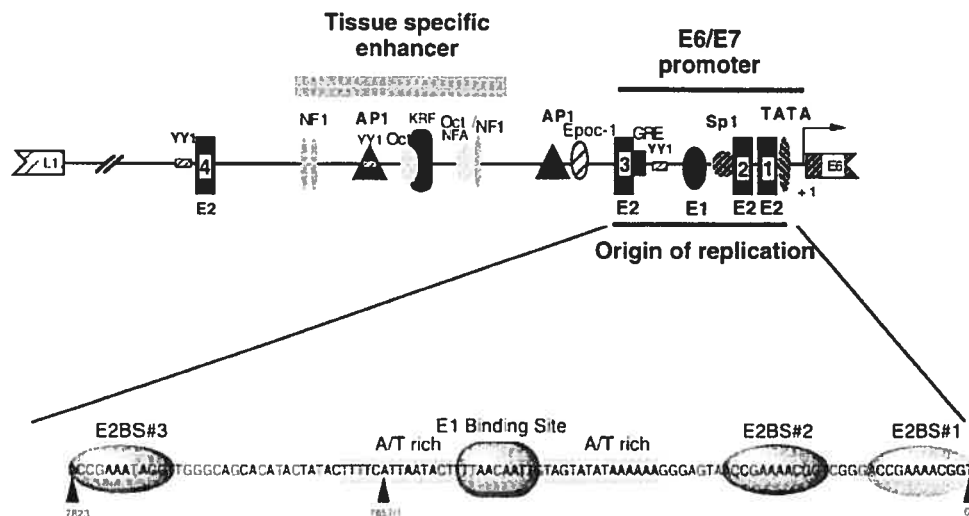


Figure 3 : Organisation de la longue région contrôle des HPV génitaux. Le génome viral contient une longue région non codante impliquée dans la régulation de l'expression des gènes viraux et dans l'initiation de la réplication. Elle peut être sous-divisée en trois sections. La région 5' contient des éléments de régulation des transcrits tardifs. La portion centrale contient de nombreux sites pour la liaison de facteurs de transcription qui modulent la transcription des gènes viraux dépendamment de la différenciation des kératinocytes. L'extrémité 3' participe également à la liaison de facteurs contrôlant la transcription et est également l'origine de réplication. (Desaintes et Demeret (1996). *Semin Cancer Biol* 7:339-47 (47))

2.1.2. Protéines virales

2.1.2.1. Les oncogènes E5, E6 et E7

E5 est une petite protéine hydrophobique transmembranaire localisée au golgi, au réticulum endoplasmique et à la membrane nucléaire (34). Sa fonction demeure peu connue à ce jour. Chez les HPV, elle a une faible activité de transformation cellulaire (revu dans (50)). La perte d'E5 résultant en un défaut au niveau des fonctions tardives d'amplification du génome viral et de l'expression des gènes viraux tardifs, on estime que sa fonction principale s'exerce probablement au niveau des cellules différenciées, possiblement via l'activation de la prolifération cellulaire dans ces cellules (67). Elle semble notamment importante pour stimuler la croissance cellulaire via la modulation de la signalisation des récepteurs de facteurs

de croissance (106, 219). Au niveau endosomal, l'interaction d'E5 avec une sous-unité de la pompe ATPase vacuolaire affecte le recyclage des molécules de surface et altère ainsi le trafic endocytaire (218, 219, 234). Elle retient également le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) au golgi en interagissant avec la chaîne lourde, interférant par conséquent avec la présentation d'antigènes viraux aux lymphocytes T cytotoxiques (5, 147).

Les protéines **E6 et E7** ont un rôle significatif dans le développement de la malignité chez les HPV à haut risque. Par leur capacité à maintenir les cellules dans le cycle cellulaire malgré leur différenciation et à contourner les points de contrôles cellulaires, ces protéines sont requises à la réplication et au maintien des génomes viraux épisomaux lors de l'infection (174, 230). Bien que ces protéines soient conservées chez tous les HPV génitaux, leur pouvoir oncogénique est toutefois variable. Cette section se concentrera donc sur les propriétés des protéines des HPV à haut risque. D'action pléiotropiques, elles interagissent avec de multiples protéines cellulaires résultant en une activation de la croissance cellulaire, une inhibition de l'apoptose, une instabilité génomique et une inactivation des voies de défense cellulaire (revu dans les références (140, 160, 271)). Seules les principales activités de ces protéines seront abordées.

Bien que l'immortalisation efficace des kératinocytes humains requiert E6 et E7 (91), la protéine **E6** des types oncogéniques permet à elle seule la transformation de cellules NIH 3T3 ainsi que l'immortalisation de cellules épithéliales mammaires humaines (118, 137). Une importante cible d'E6 est le célèbre suppresseur de tumeur p53 (249), un facteur de transcription qui, en réponse à certains stress cellulaires, active l'expression de gènes responsables de l'arrêt du cycle cellulaire ou de l'apoptose. E6 lie p53 dans un complexe ternaire impliquant E6AP (protéine associée à **E6**), une ubiquitine ligase (103). Il en résulte l'ubiquitination de p53 et sa dégradation par le protéasome (101, 104). E6 pourrait également agir indirectement sur la transcription des gènes régulés par p53 en liant et inactivant un co-activateur transcriptionnel de p53, la protéine p300/CBP (269).

E6 a également une autre activité anti-apoptotique par la dégradation de la protéine Bak, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 (231, 232). En plus de prévenir l'apoptose, E6 contribue à l'immortalisation des cellules en encourageant la survie par l'activation de la télomérase (120). L'activation se fait au niveau transcriptionnel, dépendamment d'une « E-box » liant le facteur de transcription c-myc au niveau de la région promotrice de la télomérase (243). E6 prévient ainsi le raccourcissement des télomères qui se produit normalement au cours des divisions cellulaires et conduit à la sénescence.

Enfin, les protéines E6 oncogéniques possèdent un site d'interaction aux domaines PDZ, ce qui leur permet de lier et/ou dégrader ces protéines (80, 119, 130, 131, 163, 233). Notamment, plusieurs protéines avec des domaines PDZ sont impliquées dans la signalisation cellulaire et l'adhésion intercellulaire. L'interaction d'E6 aux domaines PDZ est d'ailleurs requise pour l'induction de l'hyperplasie *in vivo* (168).

Quant à E7, elle est suffisante pour induire une dysplasie de haut grade et la progression vers le cancer dans un modèle murin de carcinogenèse et peut aussi, à faible fréquence, immortaliser les kératinocytes humains (88, 161, 190). Un événement clé dans l'activité oncogénique d'E7 est sa liaison à la protéine du rétinoblastome (pRb) (58). Cette famille de protéines est bien connue pour son implication dans de nombreux cancers en tant que suppresseur de tumeur alors inactivé. La fonction cellulaire de pRb est la séquestration des membres de la famille des facteurs de transcription E2F. Ceux-ci activent la transcription de nombreux gènes de protéines nécessaires à la réplication et permettent ainsi la transition de la phase G1 à S du cycle cellulaire. L'interaction d'E7 avec pRb résulte en sa dégradation par le protéasome, ce qui permet la relâche des facteurs de transcription E2F et l'activation du cycle cellulaire résultante (86, 245). E7 stimule également la croissance en interagissant avec les déacétylases d'histones de classe I (HDAC) (18, 139) qui répriment l'expression de gènes par deacétylation de la chromatine. Via cette interaction, E7 permet de relever l'inhibition par les HDAC et de spécifiquement

augmenter la transcription par E2F2 dans les cellules différenciées (141). De plus, une interaction directe avec le facteur de transcription E2F1 pourrait favoriser la croissance cellulaire indépendamment de la dégradation de pRb (107).

E7 stimule aussi, directement ou indirectement, les cyclines A et E impliquées dans la régulation des événements de la phase S (149, 238, 262). En complexe avec leur sous-unité kinase (Cdk), ces cyclines induisent notamment la phosphorylation de pRb et provoquent ainsi la libération d'E2F. Dans le même but de favoriser l'état actif de ces complexes et de ce fait la prolifération cellulaire, E7 bloque également les inhibiteurs de Cdk p21 et p27 (78, 111, 261).

Bref, E7 agit principalement dans la promotion de la prolifération cellulaire alors qu'E6 inactive les voies qui pourraient causer l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. Il en résulte une instabilité génomique et l'accumulation de mutations qui contribuent au développement de cancers. De façon coopérative, E6 et E7 permettent ainsi le maintien des cellules en division malgré leur différenciation et la prévention de l'apoptose, actions nécessaires au déroulement du cycle réplcatif viral au sein de l'épithélium en différenciation (174, 230).

2.1.2.2. La protéine réplcatrice E1

Outre la machinerie de réplcation cellulaire, la réplcation du génome viral des PV dépend des deux protéines virales : E1 et E2. **E1** est une protéine nucléaire (226) exprimée tout au long du cycle viral avec une prédominance au niveau des kératinocytes différenciés, lorsque le promoteur tardif est actif (177). C'est une protéine initiatrice de la réplcation du fait qu'elle lie l'ADN viral au niveau de l'origine de réplcation et s'y assemble en un double hexamère encerclant l'ADN et ayant une activité hélicase. Par son interaction avec certaines protéines cellulaires, elle permet aussi le recrutement de la machinerie de réplcation cellulaire au niveau de la fourche de réplcation virale. La structure et les fonctions d'E1 seront décrites en détail dans les prochaines sections.

2.1.2.3 La protéine multifonctionnelle E2

La protéine **E2**, également nucléaire, se retrouve principalement dans des foci qui co-localisent avec la protéine PML (« **promyelocytic leukemia protein** »), une composante des domaines ND10 qui ont d'ailleurs été suggérés pour être le site de la réplication du génome viral et de l'encapsidation (40, 71, 226). E2 est constituée de deux domaines, soit un domaine C-terminal de liaison à l'ADN et d'homodimérisation, et un domaine N-terminal de transactivation de la transcription, ces deux domaines étant séparés par une région charnière variable selon les PV. Sous forme de dimère, E2 lie l'ADN viral au niveau de séquences consensus (ACCN₆GGT où N peut être n'importe quel nucléotide) où elle régule la réplication, la transcription des gènes précoces viraux et la ségrégation des génomes viraux.

Concernant son implication dans la transcription, E2 peut agir à la fois en tant qu'activateur et répresseur. Toutefois, bien qu'elle ait démontré une activité d'activation de la transcription lors d'essais cellulaires utilisant un gène rapporteur (123), E2 semble être d'abord un répresseur de l'expression des gènes précoces dans le contexte du génome (13, 209). La concentration d'E2 semble déterminante pour son activité transcriptionnelle, la liaison d'E2 au niveau de ses sites sur l'origine étant en compétition avec la liaison de facteurs cellulaires tels Sp1 et TFIID (42, 55). Notamment, la liaison d'E2 semble interférer avec la formation d'un complexe d'initiation de la transcription (97). De plus, E2 interagit avec divers facteurs de transcription cellulaires et pourrait donc également influencer la transcription de gènes cellulaires (87, 158, 214).

Mentionnons aussi que d'autres formes d'E2 agissant sur la transcription sont produites. De tels **variants d'E2** consistant en des troncations où le domaine de transactivation est absent ont d'abord été caractérisés chez BPV1 (29, 100, 127). Possédant seulement le domaine C-terminal de liaison à l'ADN, ces variants agissent en tant que répresseurs de la transcription, probablement par un mécanisme de compétition pour la liaison à l'ADN. L'existence de variants d'E2, où le domaine C-terminal d'E2 est en fusion avec E8 (**E8^{E2C}**) a également été reportée chez les

HPV (54). Chez ces derniers, E8^{E2C} est également un répresseur de la transcription dépendante ou non d'E2, capable d'agir à distance. De plus, E8^{E2C} inhibe la réplication du génome viral et est essentielle au contrôle du nombre de copies d'épisomes viraux et à leur maintien au fil des divisions (27, 220, 221).

Outre son rôle dans la transcription, E2 est également requise à la réplication du génome viral. L'affinité d'E1 pour ses sites est insuffisante pour son recrutement sélectif sur l'ori *in vivo*. En interagissant directement avec E1, E2 permet ainsi son recrutement spécifique sur l'origine grâce à leur liaison coopérative sur leurs sites adjacents. Aussi, bien qu'impliquée dans les premières étapes d'assemblage d'E1 sur l'ADN, E2 est subséquemment relâchée au cours de la formation du complexe hélicase actif (voir section 4.2.1.4.1). Elle favorise donc également la réplication en assurant un assemblage ordonné d'E1 sur l'ADN (1).

Protéine multifonctionnelle, E2 est de plus importante pour la ségrégation des génomes viraux. Dépendamment d'E2, les génomes viraux s'associent aux chromosomes ou aux fuseaux mitotiques afin d'assurer leur répartition dans les cellules filles, processus nécessaire au maintien des génomes au fil des divisions cellulaires (108, 241, 258). Chez BPV1, l'association d'E2 aux chromosomes mitotiques est assurée par la protéine à bromodomaines (domaine de liaison aux histones acétylés) Brd4 (« bromodomain-containing protein 4 ») (258, 259). Chez les HPV, bien que l'interaction entre E2 et Brd4 soit conservée, elle est plutôt impliquée dans la transcription (201, 205, 254). D'ailleurs, la localisation des HPV E2 du groupe « a » lors de la mitose diffère de celle de BPV E2, localisant aux fuseaux mitotiques plutôt qu'aux chromosomes et ce, indépendamment de Brd4 (36, 150, 241).

Enfin, mentionnons qu'E2 pourrait posséder une activité anti-proliférative. Notamment, la surexpression de la protéine E2 des types oncogéniques induit l'apoptose dans différentes lignées cellulaires transformées ou non par HPV (43, 48, 247). La distribution intracellulaire des protéines E2 diverge selon les types en raison d'une séquence de localisation nucléaire (SLN) dans la région charnière présente

notamment chez HPV11 mais absente chez les HPV à hauts risques d'oncogenèse (270). Or, la localisation cellulaire serait importante pour l'induction de l'apoptose car celle-ci dépendrait de la localisation de la protéine au cytoplasme où elle déclencherait l'apoptose via la voie extrinsèque impliquant la caspase-8 (14).

2.1.2.4 La protéine E1^{E4}

Le transcrit encodant la protéine E1^{E4}, qui résulte de la fusion par épissage des cinq premiers acides aminés d'E1 au cadre de lecture d'E4 (165), est de loin le plus abondant des transcrits viraux (30). Malgré tout, la fonction de la protéine E1^{E4} demeure peu connue. Les transcrits contenant E1^{E4} sont exprimés tout au long du cycle viral. Cependant, c'est sous le contrôle du promoteur tardif qu'ils sont le plus fortement produits (154, 180). E1^{E4} est donc prédominante dans les cellules différenciées des couches supérieures. C'est une protéine cytoplasmique formant des multimères via son extrémité C-terminale et qui possède un site en N-terminal permettant son association aux cytokératines (191, 246). Une implication dans la sortie des virus a été proposée dû à son association aux kératines (246) entraînant le collapse du réseau de cytokératines et à son induction d'anomalies morphologiques au niveau de l'enveloppe cornée des kératinocytes (19). Cependant, ce phénotype n'est pas observé dans les lésions induites par HPV (53). Elle joue également un rôle dans l'amplification du génome viral, un mutant E1^{E4} dans le contexte du génome ayant démontré un défaut à ce niveau chez les HPV à hauts risques (251, 252).

2.1.2.5 Les protéines tardives L1 et L2

Exprimées sous le contrôle du promoteur tardif, les deux protéines tardives sont seulement produites dans les couches supérieures où les kératinocytes sont différenciés (176). Elles sont les deux protéines structurales qui composent la capside virale, un icosaèdre composé de 360 monomères de L1 assemblés en 72 pentamères (26), auxquels sont associés probablement douze protéines L2 (figure 4).

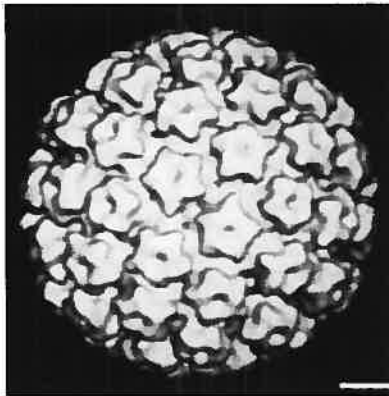


Figure 4 : Schéma de la capside virale des papillomavirus. (Baker *et al.* (1991). *Biophys J* **60**:1445-56 (8)).

L2 est une protéine nucléaire qui s'accumule au niveau des domaines nucléaires ND10 et induit leur réorganisation (10, 40, 72). Outre son rôle structural, L2 est impliquée dans la translocation du génome viral au noyau lors de l'infection. Elle permet d'abord l'échappement du compartiment endosomal (113, 189) et, grâce à son domaine d'interaction avec l'ADN, lie le génome viral qu'elle achemine jusqu'aux domaines nucléaires ND10 par transport rétrograde le long des microtubules via une interaction avec la dynéine (70). De plus, par sa capacité d'interagir avec la protéine majeure de la capside L1 et de lier l'ADN, L2 participe à l'encapsidation du génome viral (95, 175).

Cette section s'attardait aux fonctions de chaque protéine du point de vue biomoléculaire. Dans le prochain chapitre, l'implication de ces protéines dans le cycle viral sera mise dans le contexte temporel et dimensionnel de l'épithélium stratifié.

3 CYCLE RÉPLICATIF DES PAPILLOMAVIRUS

3.1 Cycle répliatif au sein de l'épithélium stratifié

Le cycle répliatif des PV est étroitement lié au programme de différenciation des kératinocytes au sein de l'épithélium stratifié. L'épithélium des muqueuses et de la peau est constitué de plusieurs couches de cellules. La couche la plus profonde, appelée couche basale, est monocellulaire et contient les cellules souches qui, par division cellulaire, donnent naissance aux cellules de la strate suivante, la couche épineuse. Lors de ce processus, une cellule fille demeure une cellule souche de la couche basale alors que la seconde sort du cycle cellulaire et amorce sa différenciation. Les cellules en différenciation migrent graduellement vers la surface de l'épithélium, poussées vers les couches supérieures par les divisions successives des cellules en division de la couche inférieure. Tout au long de leur cheminement, les cellules modifient leur profil d'expression protéique, exprimant notamment de plus en plus de kératines. Au niveau de la couche granuleuse, qui succède à la couche épineuse, les cellules sont chargées de grains de kératohyaline qui peuvent remplir totalement les cellules, détruisant les organelles et causant la perte du noyau. L'aboutissement de cette différenciation des kératinocytes est la génération de squames emplis de kératine au niveau de la couche la plus superficielle. Ces squames se détachent de l'épithélium à la même vitesse que les cellules sont remplacées par l'activité mitotique de la couche inférieure (82). Ainsi, dans un épithélium sain, seules les cellules basales se divisent. Toutefois, lors d'une infection à PV, la réplication virale nécessite les facteurs cellulaires de la phase S. Ainsi, la protéine E7 assure la progression du cycle cellulaire et les cellules infectées se distinguent donc par le maintien des cellules en phase S et la conservation de leur noyau, alors qu'elles poursuivent tout de même leur différenciation.

La différenciation cellulaire est accompagnée d'une réorganisation du profil d'expression protéique. Le virus exploite ces différents profils pour réguler

l'expression de ses protéines et sa réplication. Tôt lors de l'infection, dans les couches inférieures de l'épithélium, les transcrits initiés aux promoteurs précoces encodent principalement les protéines E6 et E7, qui contrôlent la progression du cycle cellulaire, et les protéines E1 et E2 requises à la réplication du génome viral et à son maintien lors des divisions cellulaires (105, 177). Au niveau des premières cellules infectées, le génome est d'abord répliqué pour atteindre environ 50 à 100 copies par cellules (128, 212). Cette première phase d'amplification limitée constitue la phase d'établissement. Dans les cellules parabasales, une phase de maintien est par la suite établie au cours de laquelle le nombre de copies génomiques reste stable au cours des divisions. Pour conserver ce nombre de copies, soit le génome est répliqué une seule fois par cycle de division, conjointement au génome cellulaire, soit sa réplication est aléatoire, c'est-à-dire que certains épisomes se répliquent quelques fois par cycle, d'autres une seule fois ou encore pas du tout, avec comme résultante un nombre de copies en moyenne constant. Certaines évidences appuyant ces deux modèles ont été reportées, le mode de réplication semblant dépendre du contexte cellulaire (94).

Alors que les transcrits initiés aux promoteurs précoces sont produits tout au long du cycle réplcatif viral, dans les couches supérieures s'ajoutent les transcrits initiés au promoteur tardif (105, 178). Celui-ci est activé dépendamment de la différenciation cellulaire et régit la production des protéines E1[^]E4 et E5 ainsi qu'E1 (105, 177). C'est particulièrement sous la régulation du promoteur tardif que s'amorce également la transcription des protéines structurales L1 et L2 (176, 178). Son activation coïncide de plus avec la réplication prolifique du génome viral. En effet, une phase d'amplification massive du génome viral survient dans les couches épithéliales supérieures et conduit à l'obtention de plusieurs centaines, voir milliers de copies par cellules (12, 121, 177). Cette phase d'amplification permet la génération de nombreux génomes qui sont subséquemment incorporés dans les capsides virales nouvellement synthétisées. La production des protéines de la capside étant restreinte aux couches superficielles de l'épithélium, c'est uniquement à ce niveau que se produisent l'assemblage et donc la genèse des nouveaux virions.

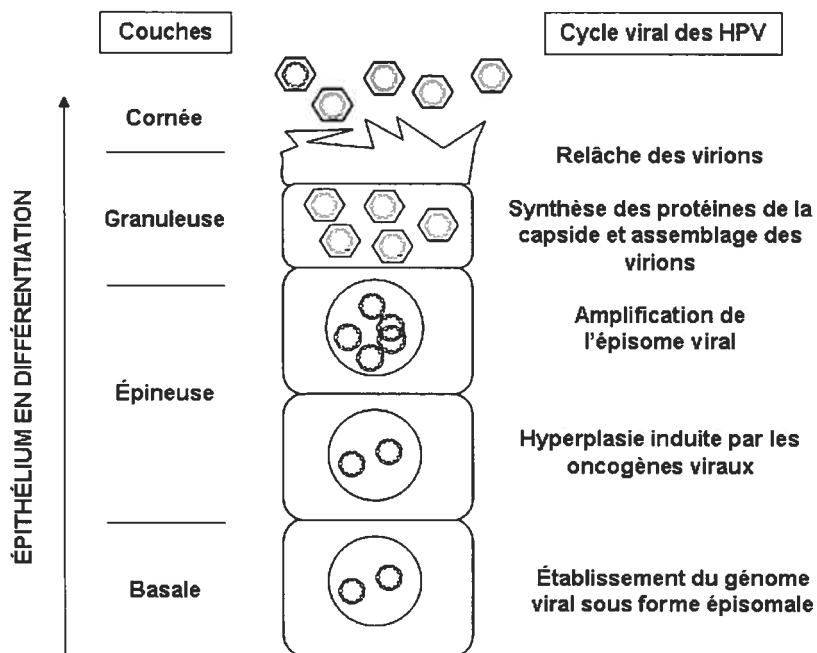


Figure 5 : Cycle réplcatif viral au sein de l'épithélium en différenciation. Suite à l'infection d'une cellule basale par un HPV, le génome viral est d'abord établi sous forme d'épisomes extra-chromosomaux présents en 50 à 100 copies dans le noyau des cellules indifférenciées. La réplcation du génome viral dépendant des facteurs cellulaires de la phase S, l'expression des oncogènes viraux permettent la progression du cycle cellulaire dans les cellules infectées malgré l'amorce de leur différenciation, ce qui produit une hyperplasie. Suivant la différenciation des kératinocytes, le génome est amplifié en milliers de copies par cellules et la production des protéines de la capside est amorcée. L'aboutissement de ce cycle est l'assemblage des nouveaux virions et leur relâche au niveau des couches les plus superficielles de l'épithélium. (D'après Fradet-Turcotte et Archambault (2007). Antiviral Therapy (74))

3.1.1. Régulation de l'expression des protéines virales

Tel que mentionné à la section 2.1.1, de nombreux facteurs de transcription cellulaires possèdent des sites de liaison au niveau de la LCR et régulent l'expression des protéines virales précoces. La présence et la quantité de ces différents facteurs varient en fonction du stade de différenciation cellulaire (248), générant différentes combinaisons de facteurs qui modulent ainsi l'expression des gènes viraux au cours du cycle réplcatif. Les PV encodent de plus leur propre facteur de transcription viral : la protéine E2. Chez les HPV génitaux, E2 possède quatre sites de liaison d'affinité variable au niveau de la région contrôle. L'affinité la plus élevée est pour le site #4, qui est le plus éloigné du promoteur précoce majeur (figure 3). Alors que les trois autres sites exercent une répression, le site #4 a démontré une activité activatrice sur la transcription des gènes précoces (213). En concordance avec l'observation qu'E2 active l'expression des gènes précoces à faible concentration, la petite quantité d'E2 d'abord présente lors de l'infection pourrait ainsi d'abord activer la transcription des gènes précoces via la liaison du site activateur #4. Les protéines précoces sont alors produites, permettant la progression du cycle cellulaire et la réplication du génome viral, jusqu'à ce qu'E2 atteigne une certaine concentration où les sites répresseurs, près du promoteur, deviennent occupés (213). Cette activité inhibitrice est due notamment à l'interférence avec la liaison d'autres facteurs de transcription cellulaires tel TFIID et SP1, dont les séquences de liaison chevauchent ou avoisinent celles d'E2 (52, 227).

Le paragraphe précédent présente l'importance des facteurs de transcription dans la régulation de l'expression des protéines virales précoces. Toutefois, leur action dépend de l'accessibilité de l'ADN, notamment influencée par la méthylation. Des protéines spécifiques reconnaissent les cytosines méthylées et recrutent subséquemment d'autres facteurs encourageant la compaction de l'ADN, inhibant l'expression des gènes. Le génome des HPV est méthylé de façon inégale et cette modification influence potentiellement l'expression des protéines virales. L'activité des méthylases d'ADN étant influencée par le statut de différenciation cellulaire, cette

modification pourrait ainsi contribuer à la régulation du cycle réplcatif viral à travers les couches cellulaires (20, 117, 192).

L'expression des protéines virales dépend également de régulations post-transcriptionnelles. Les PV encodent leurs protéines dans un petit génome et exploitent l'épissage alternatif pour réguler l'expression de leurs protéines en relation avec la différenciation cellulaire (9). L'épissage des ARNm repose sur la présence de signaux conventionnels d'épissage, qui sont toutefois sub-optimaux chez les PV. Par exemple, trois sites d'épissage sont documentés dans la séquence codante d'HPV11 E1, dont un site donneur dominant au nucléotide 847, à 5 acides aminés de l'extrémité aminée (45). Lors d'une infection productive, l'ARNm contenant la séquence entière d'E1 est rarement détecté. La majorité des transcrits sont épissés de façon à produire la fusion E1^{E4} (847³³²⁵). L'épissage 847²⁶²², moins efficace, a quant à lui le potentiel de produire la protéine E2 (30, 165, 195). D'autres espèces d'ARNm codant pour E1 et E2 ont également été détectées, révélant diverses possibilités d'épissage. L'épissage alternatif de l'ARNm peut ainsi réguler la production d'E1 et E2, ce qui aura également un impact sur l'efficacité de la réplcation du génome viral. À noter que plusieurs signaux additionnels modulent l'efficacité de l'épissage, tels les signaux amplificateurs ou supprimeurs de l'épissage des exons ou des introns. La distance entre l'intron et la coiffe de guanine en 5' pourrait également influencer (266). Ainsi, la reconnaissance de ces signaux par des facteurs cellulaires dont l'expression varie selon la différenciation des kératinocytes permet de réguler l'épissage des ARNm et leur potentiel codant de manière temporelle (revu dans (265)).

La polyadénylation (polyA) est un autre processus post-transcriptionnel qui, conjointement à l'épissage, régule le potentiel codant des ARNm. La presque totalité des transcrits produits lors des premiers stades viraux sont adénylés au site précoce grâce à des éléments de régulation inhibant l'utilisation du site tardif et d'autres encourageant celle du site précoce (79, 116, 228). Le choix de la séquence de polyA semble être dirigé par la liaison de facteurs cellulaires au niveau de ces éléments, la

variation du niveau de ces facteurs au cours de la différenciation pouvant expliquer la transition vers le site tardif (172, 229).

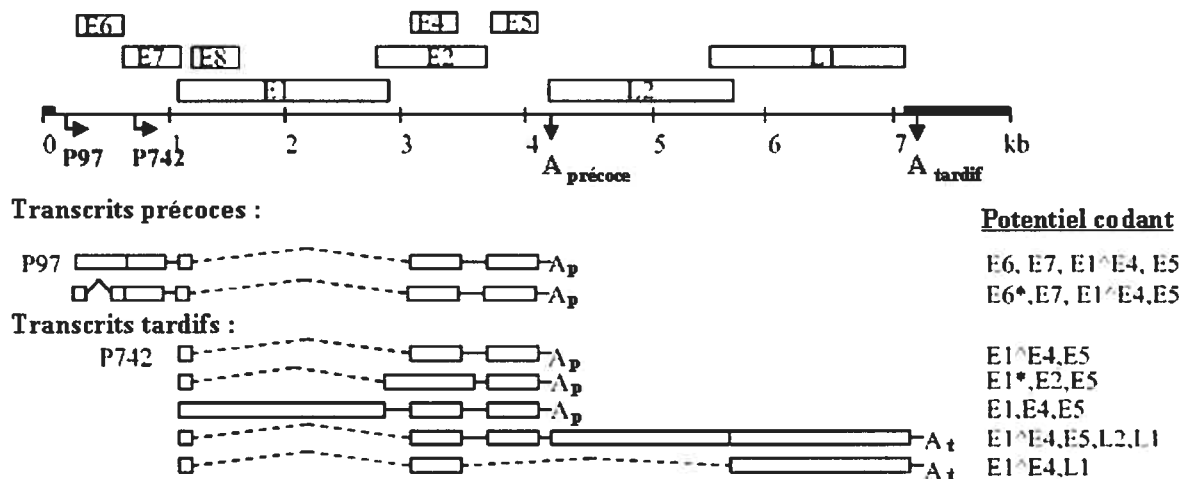


Figure 6 : Carte des transcrits d'HPV31. Schéma du génome linéarisé où sont illustrées les protéines virales, les deux principaux promoteurs (flèches) ainsi que les deux séquences de polyadénylation (A). Les différentes espèces d'ARNm sont produites suite à l'utilisation alternative des promoteurs précoce et tardif et par l'épissage alternatif des transcrits. Les principaux transcrits précoces et tardifs sont illustrés, les protéines encodées étant notées à la droite. (D'après Spink et Laimins (2005). *J Virol* 79:4918-26 (210)).

Suite à la maturation des ARNm viraux, d'autres niveaux de régulation viennent influencer l'expression des protéines virales. Les séquences codantes virales contiennent notamment plusieurs codons rares (264). Leur traduction est donc limitée par l'abondance des ARN de transfert (ARNt) correspondant à ces codons (267). De plus, le profil d'expression des ARNt change lors de la différenciation des kératinocytes, influençant l'efficacité de traduction des ARNm viraux. Ce changement de profil permet notamment l'augmentation de la production de L1 dans les derniers stades (263).

Aussi, puisque les transcrits viraux sont polycistroniques et que les ribosomes scannent les ARNm jusqu'à un signal d'initiation à partir de l'extrémité 5', la traduction des séquences en aval repose sur des mécanismes d'évitement ou de réinitiation de la traduction. Les stratégies utilisées pour la traduction des protéines des PV sont toutefois peu documentées. Enfin, d'autres mécanismes peu étudiés dans le contexte des PV, tel la stabilité de l'ARNm et son export nucléaire, pourraient également contribuer à réguler la production des protéines virales. En somme, il ressort que l'expression des protéines virales est très complexe et finement régulée aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel par l'environnement cellulaire changeant de l'épithélium en différenciation.

3.2 Cycle réplcatif au sein de la cellule

3.2.1. Entrée et décapsidation

Les PV pénètrent dans les cellules par endocytose. Les virus sont internalisés par endocytose médiée par la clathrine ou par les cavéoles dans le cas d'HPV31 (16, 39, 204). La première étape d'adsorption des virus à la surface de la cellule fait intervenir les glycosaminoglycans de type héparane sulfate (84, 112, 204). Ces derniers, des polymères de sucres chargés négativement et fortement répandus à la surface cellulaire, servent d'ailleurs à l'adsorption de plusieurs virus à la surface des cellules, incluant ceux de l'herpès et de l'immunodéficience acquise humaine (156, 239). Quant au récepteur médiant l'entrée des PV, il n'est toujours pas connu à ce jour.

Suite à l'entrée, les virus sont donc présents dans les endosomes, compartiments acides où se produit l'étape de décapsidation (38). L'échappement du compartiment endosomal est médié par L2 et dépend de son clivage par la furine (189) ainsi que d'un peptide déstabilisant la membrane à l'extrémité C-terminale de L2 (113). Aussi, L2 localise aux domaines nucléaires ND10 et, grâce à ses SLN et par sa capacité à lier le génome viral, y entraîne le génome viral lors de l'établissement initial (11, 222, 268).

3.2.2 Réplication du génome viral

Les domaines nucléaires ND10 ont été proposés pour être le site de la réplication du génome viral (226), fonction assurée par les protéines virales E1 et E2 en conjonction avec la machinerie de réplication cellulaire. Les PV utilisent un mode de réplication bidirectionnelle initiée au niveau de l'unique origine de réplication virale (ori) située à l'extrémité 3' de la LCR (6, 73, 255). E1 est la principale protéine initiatrice de la réplication du génome viral. Elle lie l'ori au niveau d'une séquence palindromique d'environ 18 pb, qui contient 4 sites de liaisons de 5-6 pb agencés en deux paires inversées (23, 24, 235). Toutefois, E1 lie ses sites avec une spécificité et une affinité de liaison insuffisantes pour une initiation sélective au niveau de l'ori *in vivo*, qui requiert la protéine virale E2 (51, 143, 155, 202, 206, 256). Trois sites de liaison pour E2 bordent la séquence de liaison d'E1. E2 interagissant directement avec E1, les deux protéines lient l'ADN de façon coopérative, positionnant spécifiquement E1 sur l'ori. Le complexe ternaire E1-E2-ori est la base de l'assemblage d'E1 sous forme d'hexamères encerclant l'ADN, forme active de l'hélicase (203). La liaison d'E1 sur l'ADN permet la séparation des brins d'ADN, séparation favorisée par l'enrichissement en bases A/T en bordure des sites de liaison d'E1, ces bases facilitant la séparation des brins d'ADN puisque deux liens hydrogènes les relient contre trois liens formés entre les bases GC. Les détails de l'initiation de la réplication par E1 seront présentés à la section 4.2.1.4.

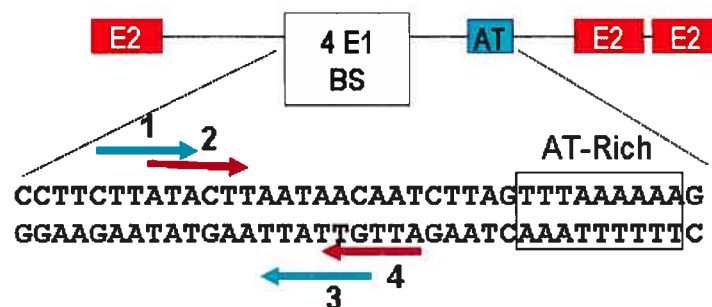


Figure 7 : Organisation de l'origine de réplication virale. La séquence de liaison d'E1, un palindrome contenant 4 sites agencés en paires inversées, est bordée par trois sites de liaison pour E2. La protéine E2 lie avec une grande affinité au niveau de ses sites, permettant un recrutement spécifique d'E1 sur l'origine. Une séquence riche en bases A/T est située à proximité des sites d'E1, favorisant la séparation des brins. (D'après Titolo *et al.* (2003). J Virol 77:5178-91 (235))

3.2.2.1. Régulation de la réplication du génome viral

La réplication de l'épisome viral dépend dans un premier temps de la machinerie de réplication cellulaire, présente et active dans la phase S du cycle cellulaire et par conséquent, du maintien des cellules en division par l'expression des oncogènes viraux. Dans un deuxième temps, les protéines virales E1 et E2 sont bien entendu également requises, mais en plus de leur quantité absolue, leur abondance relative a un impact significatif sur l'efficacité de réplication (45). Ainsi, par leur effet sur la production des différentes protéines virales, les différents niveaux de régulation décrits à la section 3.1.1 auront également un impact sur l'efficacité de la réplication du génome.

Tout comme la transcription des protéines virales, la réplication du génome varie à travers les couches épithéliales. La liaison de facteurs cellulaires au niveau de la région contrôle contribue à cette régulation. Par exemple, la protéine cellulaire CDP (« CCAAT displacement protein ») est impliquée dans le contrôle de la réplication du génome viral en début d'infection. CDP est un facteur de transcription exprimé uniquement dans les cellules non différenciées et qui réprime la transcription des gènes viraux précoces via sa liaison sur plusieurs sites de la région

régulatrice (2, 171). En agissant sur la transcription, il régule à la baisse la quantité des protéines précoces nécessaires à réplication du génome. Or, la réplication dépend des niveaux d'E1 et E2 qui sont en compétition avec les facteurs cellulaires pour la liaison à l'ori. De plus, CDP possède un site de liaison entrecoupant celui d'E1 et inhibe également la réplication en compétitionnant pour la liaison à l'ADN (164). Cet exemple illustre donc comment les facteurs de transcription cellulaires peuvent influencer la réplication du génome viral via la modulation de l'expression des protéines virales et par compétition pour la liaison à l'ADN.

Enfin, on ne connaît pas bien les mécanismes régulant les transitions entre les trois phases de réplication (établissement, maintien et amplification, voir section 3.1). Lors de l'établissement du génome suite à l'infection d'une cellule basale, la transcription initiale des protéines précoces, incluant E1 et E2, pourrait favoriser la première phase d'amplification modérée, jusqu'à ce que la concentration d'E2 mène à la répression des gènes précoces (voir section 3.1.1.). Puisqu'E1 et E2 sont produites sous le contrôle du promoteur précoce dans les cellules non différenciées, la capacité d'E2 d'activer ou réprimer la transcription au niveau de ce promoteur contribue au contrôle du nombre de copies génomiques au niveau des premières strates cellulaires.

Les événements déclenchant la phase d'amplification massive sont également peu compris. Dépendante de la différenciation des kératinocytes, elle repose probablement sur la présence de protéines cellulaires ou d'une combinaison de facteurs retrouvée dans ces cellules. De plus, la phase d'amplification coïncide avec l'activation du promoteur tardif (105). Les transcrits initiés à ce promoteur, qui lui n'est pas réprimé par E2, encodent notamment E1 et permettent ainsi l'accroissement de sa production dans les cellules différenciées. On croit donc que cet accroissement d'E1 permettrait un ratio E1:E2 optimal pour la réplication et participerait ainsi à la phase d'amplification (121, 177). De cette façon, l'augmentation de la réplication générerait plus de copies de génome viral, ayant le potentiel de produire encore plus de protéine répliquatives et ainsi amorcer une cascade d'amplification.

3.2.3 Assemblage et sortie

L'assemblage des virions a lieu au noyau dans les domaines ND10 où se produit également la réplication du génome, suggérant un couplage entre l'amplification du génome viral et son incorporation dans les capsides nouvellement synthétisées au niveau des couches épithéliales les plus superficielles. Suite à leur synthèse au cytoplasme, les protéines de la capside, L1 et L2, entrent au noyau via la karyophérine $\alpha 2\beta 1$ (66, 166). La protéine L2 s'accumule dans les domaines ND10 où elle recrute L1 (40). Aussi, L2 est potentiellement impliquée dans l'encapsidation des génomes viraux nouvellement synthétisés pour la génération des nouveaux virions (95, 175). Les PV sont des virus non lytiques et sont donc libérés dans l'environnement lors de la mort des cellules et de la desquamation.

Cette section a abordée l'étroite relation entre le cycle réplcatif des PV et la différenciation cellulaire. La dépendance du cycle réplcatif viral envers un environnement cellulaire changeant a longtemps freiné l'étude des PV par le manque d'un système d'étude pouvant reproduire le contexte d'infection d'un épithélium stratifié en laboratoire. Au cours des deux dernières décennies, le développement de systèmes d'études a donc grandement profité à l'avancement de nos connaissances sur le cycle réplcatif viral des PV.

3.3 Systèmes d'études biologiques

Bien que les PV infectent la plupart des vertébrés, aucun PV infectant les souris n'a été identifié, excluant l'utilisation de cette dernière comme modèle d'étude. Toutefois, l'utilisation de souris immunodéficientes auxquelles on greffe des tissus humains susceptibles à l'infection (xénogreffe) permet la reproduction fiable des caractéristiques macroscopiques, microscopiques ainsi que moléculaires d'une lésion. Cette technique permet également de générer des stocks de virions. En substitut de la souris de laboratoire, le lapin, hôte naturel du CRPV (« cotton-tail rabbit papillomavirus »), est utilisé comme modèle animal d'infection. Le lapin est

notamment utilisé pour étudier la pathogénèse d'une infection à PV et pour le développement de traitements et d'agents antiviraux.

Pour étudier les fonctions virales tardives telles l'amplification du génome et la production des protéines tardives, on peut induire la différenciation des kératinocytes en milieu semi-solide. La culture de kératinocytes en milieu semi-solide de méthylcellulose permet l'expression de protéines caractéristiques aux kératinocytes différenciés et ce, à l'intérieur de 24-48 h (196). Afin de contourner la difficulté de générer de grandes quantités de virions pour l'infection de cellules en culture, on peut alternativement transfecter des génomes viraux dans des kératinocytes, ce qui reproduit l'infection des cellules basales indifférenciées. Les cellules maintenant l'épisome viral sont par la suite sélectionnées et les fonctions tardives étudiées par culture des cellules en milieu de méthylcellulose.

La culture organotypique permet de reproduire un épithélium stratifié en laboratoire. Tout d'abord, on permet l'établissement du génome viral dans des kératinocytes primaires humains de passages peu élevés. Les kératinocytes sont par la suite cultivés sur un équivalent dermique comprenant des fibroblastes, ce qui permet la croissance et la différenciation des kératinocytes à la surface air:liquide. Un tel système de culture reproduit les différentes couches épithéliales et permet donc la différenciation des kératinocytes, avec l'expression des gènes tardifs, l'amplification du génome viral et la biosynthèse de virions qui en découlent. La culture organotypique est mieux adaptée à l'étude des types oncogéniques puisque ces derniers accroissent la durée de vie des kératinocytes primaires, permettant le nombre de passages nécessaires. Chez les cellules contenant un génome d'un HPV à bas risque, l'entrée en sénescence se produit après 2-3 passages (159). Toutefois, la découverte d'une lignée de kératinocytes spontanément immortalisés (NIKS) (3) et la disponibilité d'une lignée de kératinocytes immortalisés avec la sous-unité catalytique de la télomérase (« N-Tert cell line ») (49) permettent maintenant l'étude biomoléculaire des HPV non oncogéniques ou de génomes mutants ayant perdus leur

capacité d'immortalisation. Ce système a l'avantage de permettre l'étude génétique des fonctions des gènes viraux dans le contexte du cycle complet.

Enfin, selon le sujet à l'étude, d'autres outils sont disponibles. Par exemple, il y a possibilité d'étudier la réplication, l'amplification et l'encapsidation du génome viral dans un système hétérologue tel que la levure. Les différents outils pour l'étude des HPV ont été récemment revus (37).

4 INITIATION DE LA RÉPLICATION

4.1 Initiation de la réplication chez les eucaryotes

Dans une cellule humaine, environ 6 milliards de paires de bases doivent être fidèlement répliquées en quelques heures lors de la phase S du cycle cellulaire. Plusieurs origines de réplication sont donc mises à profit et ces régions peuvent s'étendre sur 500 à 50 000 pb chez les mammifères. Des procaryotes aux eucaryotes, l'assemblage d'un complexe de pré-réplication (pré-RC) précède l'initiation de la synthèse d'ADN. Le pré-RC est formé en phase G1 et comprend le complexe de reconnaissance de l'origine (ORC), lié à l'origine de réplication, auquel se sont séquentiellement ajoutés Cdc6 et Cdt1, puis 6 protéines MCM (« mini-chromosome maintenance proteins ») qui forment un complexe hélicase hexamérique. La conversion du pré-RC en un complexe actif marque l'entrée en phase S et est assurée par les Cdk de la phase S. En phosphorylant les protéines du pré-RC, celles-ci mènent à la dégradation ou à l'export nucléaire de certaines protéines et à l'activation d'autres, modifiant irréversiblement le pré-RC et permettant la liaison de facteurs de réplication additionnels, aboutissant ultimement à la séparation du duplex d'ADN et à l'initiation de la réplication. Ainsi, l'activité des Cdk a un double rôle dans la régulation de la réplication : l'activation du complexe d'initiation et la prévention d'une ré-initiation à l'intérieur d'un cycle par l'inhibition de la formation d'un nouveau pré-RC. Cette inhibition est assurée soit par le relâche de protéines de sur la chromatine, leur export nucléaire ou encore leur dégradation.

Les protéines de la réplication sont alors recrutées à la fourche et la réplication de l'ADN est alors amorcée. Au fur et à mesure que les brins d'ADN sont séparés, l'ADN simple brin (ADNsb) est protégé et stabilisé par la liaison de RPA (« replication protein A »), un complexe hétérotrimérique liant l'ADNsb. Entre en action également la topoisomérase I (topo I), qui provoque des coupures transitoires dans l'ADN afin de soulager la superhélicité produite par le déroulement de l'ADN. La synthèse d'ADN est assurée par les ADN polymérases cellulaires répliquatives.

Celles-ci sont recrutées sur leur long substrat d'ADN grâce à PCNA (« proliferating cell nuclear antigen »), lui-même chargé sur l'ADN par RFC (« replication factor C »). PCNA encercle l'ADN et interagit avec plusieurs facteurs de réplication. Elle procure ainsi une plateforme amovible pour le recrutement de protéines au niveau de l'ADN. Ainsi recrutées à la fourche, les polymérases utilisent une amorce simple brin pour répliquer fidèlement l'ADN dans le sens 5'-3'. Elles peuvent donc facilement répliquer le brin d'ADN d'orientation 3'-5'. Toutefois, la réplication du brin d'orientation inverse, appelé brin retardé, exige la synthèse d'amorces hybrides d'ARN/ADN par le complexe quaternaire polymérase α /primase, amorces par la suite allongées par une polymérase répllicative. Il en résulte des fragments de 100-200 pb possédant des bases d'ARN à l'extrémité 5' : les fragments d'Okazaki. Les bases d'ARN sont par la suite éliminées par la ribonucléase H, les trous remplis par des polymérases, puis le brin unifié par une ADN ligase (81, 124, 169).

4.2 Protéines initiatrices virales

La compréhension de l'initiation de la réplication chez les eucaryotes a grandement bénéficié de l'étude de la réplication du génome des petits virus à ADNdb. À elles seules, les protéines initiatrices virales telles E1 et l'antigène grand T (AgT) de SV40 reconnaissent l'origine de réplication virale, séparent le duplex d'ADN, déroulent l'ADN en amont de la fourche de réplication et recrutent les facteurs cellulaires requis à la réplication, fonctions assumées par plusieurs complexes protéiques chez les eucaryotes. Leur domaine C-terminal possède une activité hélicase similaire à celle du complexe MCM, alors que leur domaine de liaison à l'ADN peut être comparé au ORC par leur liaison spécifique à l'origine de réplication virale.

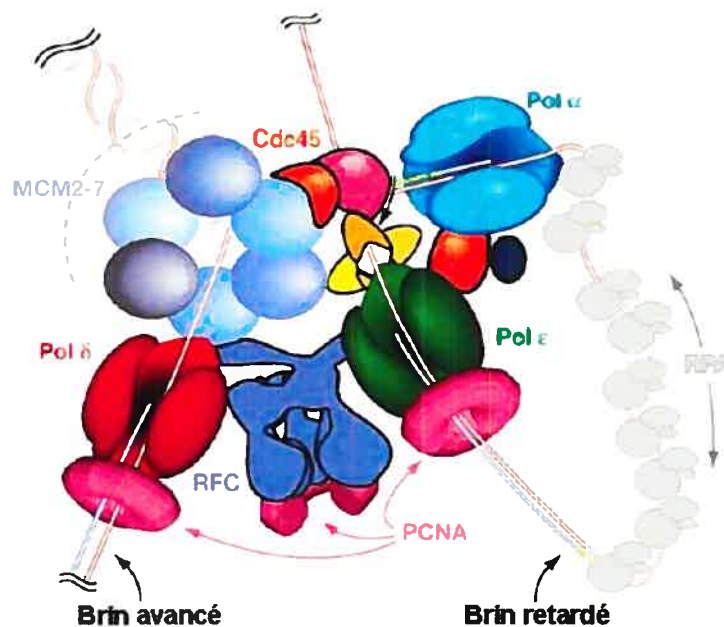


Figure 8 : Schéma de la fourche de réplication chez les eucaryotes. Le complexe hélicase MCM2-7 sépare les brins d'ADN afin de permettre la réplication des brins d'ADN par les polymérases réplcatives. Ces dernières sont fixées à l'ADN grâce à l'anneau de processivité PCNA, lui-même chargé sur l'ADN par RFC. La synthèse du brin retardé nécessite la synthèse d'amorces par le complexe pol α /primase. Suite au déroulement de l'ADN, les brins simples sont protégés et stabilisés par RPA. D'autres protéines aux fonctions encore peu connues participent également à la fourche de réplication. (D'après Johnson A. et M. O'Donnell (2005), *Annu Rev Biochem* 74:283-315 (110))

Pour la réplication de leur génome, ces virus profitent grandement de la machinerie de réplication cellulaire. Ainsi, la réplication efficace du génome des PV requiert, en plus des protéines virales E1 et E2, les polymérases α et δ , RPA, les topo I et II, RFC et PCNA (126, 153). Par leur utilisation de la machinerie de réplication cellulaire et la concentration des fonctions de complexes protéiques en une seule protéine, les protéines initiatrices virales représentent des modèles fidèles et simplifiés pour l'étude des mécanismes d'initiation de la réplication chez les eucaryotes.

Complexe de réplication chez les eucaryotes

Réplication de l'ADN viral

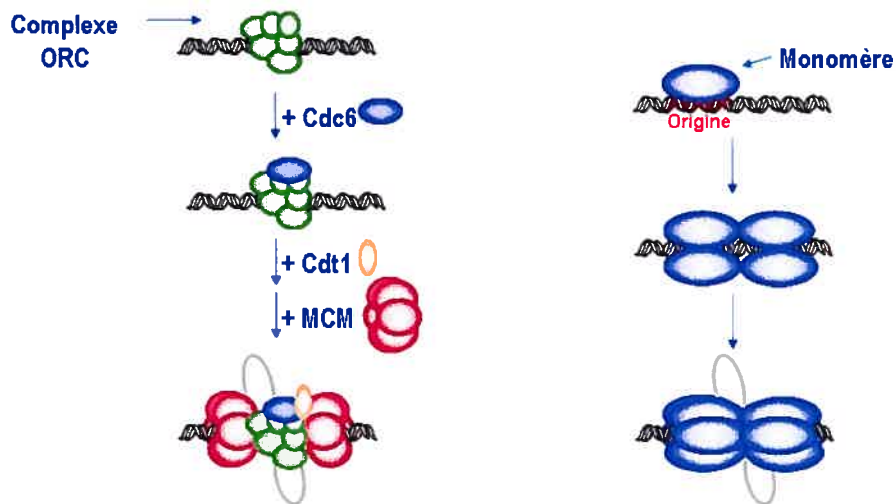


Figure 9 : Comparaison des protéines initiatrices eucaryotes et virales. L'initiation de la réplication chez les eucaryotes nécessite d'abord le positionnement du complexe de reconnaissance de l'origine de réplication, auquel s'ajoute séquentiellement les protéines cdc6 et cdt1, puis le complexe hélicase MCM. Chez les petits virus à ADN, ces fonctions sont assurées par une protéine initiatrice virale qui à elle seule lie l'origine de réplication et s'y assemble en complexe hélicase actif pour le déroulement de l'ADN.

4.2.1. L'hélicase virale E1

4.2.1.1. Classification

Les hélicases permettent la séparation d'un duplex d'acides nucléiques en dissociant les liaisons hydrogènes reliant les brins. Ces enzymes lient les acides nucléiques et utilisent l'hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate) comme source d'énergie pour dérouler l'ADN. Les hélicases sont groupées en 3 superfamilles selon la similarité et l'organisation de motifs conservés typiques aux hélicases. E1 appartient à la superfamille d'hélicases 3 (SF3) (122). Les hélicases de cette superfamille proviennent majoritairement de petits virus et possèdent en commun trois motifs caractéristiques, soit A, B, et C, contenus dans une région d'environ 100 acides aminés (93).

Le motif A, aussi dénommé motif Walker A, est impliqué dans la liaison du NTP (nucléoside triphosphate) en interagissant directement avec le phosphate γ du NTP. Le motif B (ou motif Walker B) contient un résidu aspartate (charge négative) conservé qui contacte l'ion Mg^{2+} , lequel est requis à l'hydrolyse du NTP (240). On croit également qu'un résidu glutamate conservé activerait l'eau pour la réaction d'hydrolyse (90). Enfin, le motif C (correspond au motif senseur 1) interagit avec le phosphate γ du NTP lié et on lui attribue donc un rôle dans la détection de l'état lié ou hydrolysé du NTP (90).

Par sa capacité à lier et hydrolyser les NTP et le repliement caractéristique de son domaine NTPase, E1 appartient également à la superfamille de NTPases AAA+ (ATPases associées à des activités cellulaires variées) (167). Cette superfamille est caractérisée par la présence du motif C et englobe donc les hélicases de la SF3 (167). Les domaines AAA+ sont présents dans plusieurs protéines impliquées dans le remodelage des complexes protéines-ADN et particulièrement dans les protéines initiatrices de la réplication. Les membres de cette superfamille possèdent les motifs ATPase Walker A et B et senseur 1 (ou motif C) décrits précédemment, en plus de motifs supplémentaires. Notamment, le motif senseur 2 contient une arginine conservée qui interagit avec le phosphate γ du NTP de la sous-unité adjacente, percevant ainsi l'état de phosphorylation de la sous-unité voisine (93). Il occupe ainsi une position clé pour la coordination entre l'hydrolyse du NTP et le mouvement des domaines les uns par rapport aux autres, changement de conformation qui est transmis au substrat (90).

4.2.1.2. Structure et fonctions

Composée, selon les différents types, de 593 à 681 acides aminés pour un poids moléculaire variant entre 67,5 et 76,2 KDa, E1 est la plus grosse et également la plus conservée des protéines des PV. C'est aussi la seule protéine virale ayant une activité enzymatique. Elle est constituée de trois domaines fonctionnels,

particulièrement bien caractérisés chez HPV11 qui sera donc utilisé en référence dans cette section.

Le domaine C-terminal, qui comprend les acides aminés 353-649, est le domaine possédant l'activité enzymatique hélicase/ATPase. Ce domaine isolé hydrolyse l'ATP, lie l'ADNsb et est actif pour le déroulement de l'ADN (22, 250). C'est donc dans ce domaine que sont retrouvés les motifs hélicases conservés discutés à la section précédente, concentrés entre les acides aminés 478 et 525. À l'extrémité aminée de ce domaine se situe le domaine d'interaction E1-E1 (acides aminés 353-416), responsable de l'oligomérisation de la protéine (236). Le site de liaison du NTP d'E1 n'est pas très restrictif, pouvant accommoder différents NTP et dNTP (250). La structure tertiaire du domaine C-terminal est principalement globulaire, avec comme noyau la topologie caractéristique des domaines AAA+, soit un feuillet β replié en 5 brins parallèles bordé de chaque côté par plusieurs hélices α .

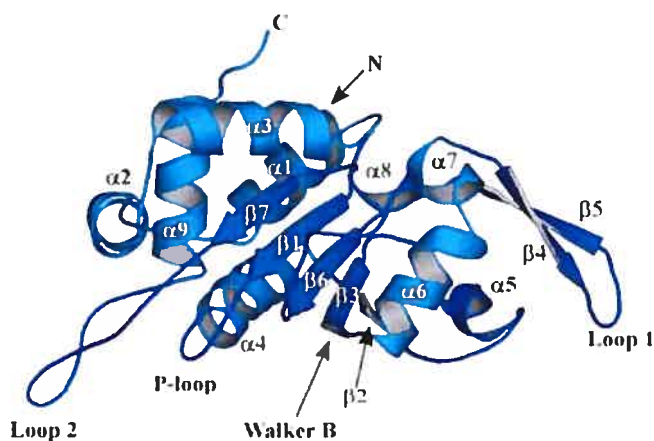


Figure 10 : Structure du domaine C-terminal d'E1. Schéma résultant du cristal de HPV18 E1(438-631) où sont annotés les motifs qui interviennent dans la liaison du NTP. (Abbate *et al.* (2004). *Genes Dev* **18**:1981-96 (1))

Au centre d'E1 (aa 191-353) se trouve le domaine de liaison à l'ADN (« DNA binding domain » ou DBD) (236). Bien que la protéine entière soit peu sélective pour ses sites de liaison dans l'ori, le DBD isolé présente une spécificité accrue. Il semble donc qu'E1 possède deux types d'interaction avec l'ADN : une interaction sélective conférée par le DBD et permettant la liaison à l'ori, et une seconde non-spécifique associée au domaine hélicase et impliquée dans l'altération de la structure de l'ADN (217). En plus de son rôle dans la liaison à l'ori, l'identification de mutations dans le DBD affectant la réplication mais pas la liaison à l'ADN suggère que le DBD a également une autre fonction pour la réplication de l'ADN (200). La cristallisation du DBD a révélée une structure tertiaire très semblable au DBD de l'AgT, malgré la divergence de leur structure primaire (61). Le DBD est composé d'un feuillet β central formé de cinq brins antiparallèles bordé de quatre hélices α (figure 12, p. 39) (7, 61).

Enfin, le domaine N-terminal est le moins bien caractérisé. C'est à ce niveau que se situe la plus grande variation entre les protéines E1 des divers PV, ceux du groupe A infectant les muqueuses possédant des résidus supplémentaires (253). Les 166 premiers aa du domaine N-terminal d'HPV11 E1 ne sont pas essentiels à la réplication *in vitro* (4), les fonctions réplcatives essentielles étant concentrées dans les deux autres domaines. Cependant, les protéines tronquées sont nettement moins actives en réplication *in vivo* (69, 223), ce qui indique que le N-terminal affecte l'efficacité de la réplication du génome viral. On lui attribue à cet effet un rôle dans la régulation de la protéine ou de son oligomérisation. C'est d'ailleurs dans ce domaine que sont localisées les séquences de localisation (SLN) et d'export nucléaires (SEN). La SLN est bipartite et située entre les acides aminés 80-85 et 120-125, alors que l'export nucléaire est assuré par une séquence riche en leucines située entre les acides aminés 96-116 (46). Aussi, le N-terminal possède un motif RxL hautement conservé pour la liaison des cyclines (CBM) et trois sites de phosphorylation pour ces complexes cyclines/Cdk (figure 11) (144), indiquant qu'E1 est régulée par ces

kinases en fonction du cycle cellulaire tel qu'il en sera discuté dans la prochaine section.

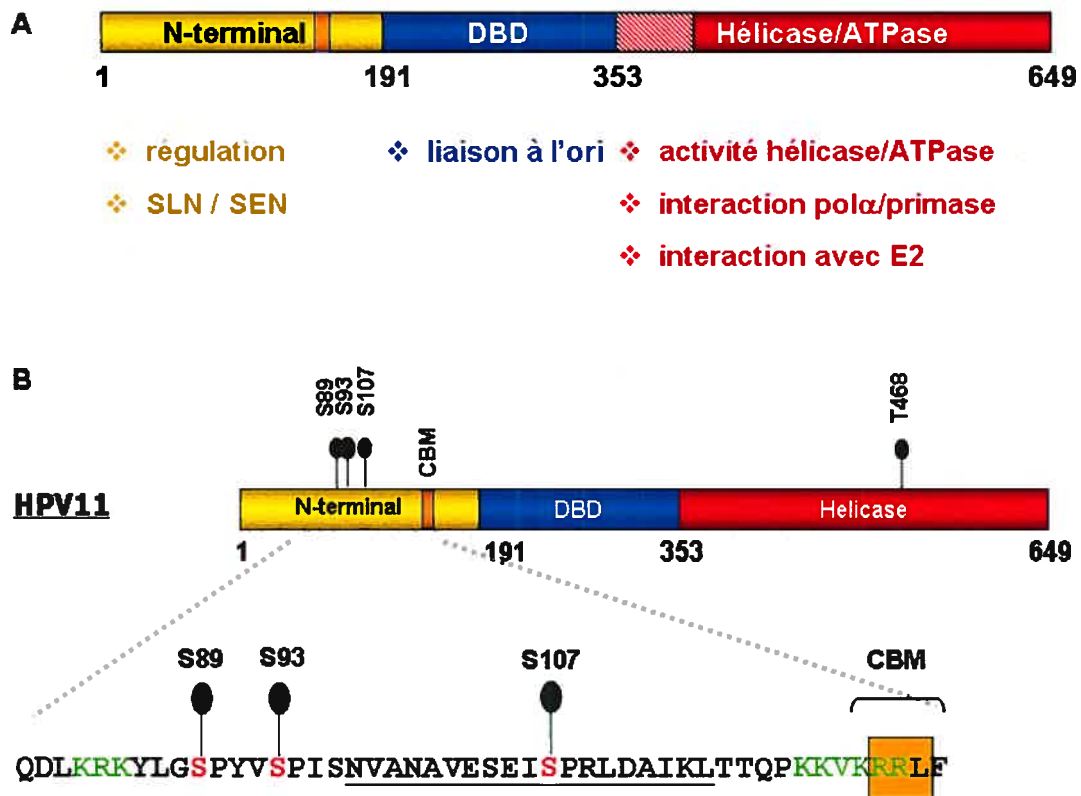


Figure 11 : Schéma des domaines fonctionnels d'HPV11 E1. A) E1 est constituée de trois domaines fonctionnels : la portion N -terminale est impliquée dans la régulation de la protéine, le domaine central permet la liaison spécifique à l'origine de réplication virale (ori) alors que la partie C -terminale possède l'activité hélicase/ATPase. C'est aussi à ce niveau qu'interagissent la polymérase α /primase et la protéine virale E2. La région hachurée représente le domaine d'interaction E1-E1 impliqué dans l'oligomérisation. B) Éléments de régulation présents dans le domaine N-terminal. Un motif RxL (carré orange) permet l'association aux cyclines. Trois résidus sérine sont phosphorylés par les complexes cyclines/Cdk2 aux positions 89, 93 et 107. La séquence d'export nucléaire (SEN) est soulignée et la séquence de localisation nucléaire (SLN) bipartite est en caractères verts.

4.2.1.3. Régulation d'E1 par des modifications post-traductionnelles

Tout comme les protéines initiatrices cellulaires, les protéines virales sont régulées par diverses modifications post-traductionnelles. E1 est notamment modifiée par phosphorylation sur plusieurs résidus et probablement par différentes kinases (35, 46, 144). Tel que mentionné précédemment, HPV E1 interagit avec les complexes kinases cyclines A-E/Cdk2, des régulateurs clés du cycle cellulaire. Cette association est notamment requise à la réplication efficace du génome viral des HPV (134, 144). Chez HPV11 E1, quatre résidus sont phosphorylés par ces kinases, soit les trois sérines du domaine N-terminal et une thréonine du domaine C-terminal (figure 11, p. 36). La phosphorylation des sérines est impliquée dans la localisation intracellulaire d'E1. Plus particulièrement, leur phosphorylation inactive la SEN, ce qui favorise la rétention d'E1 au noyau et par conséquent, la réplication efficace du génome viral (46). Concernant la phosphorylation de la thréonine en C-terminal, bien qu'elle n'affecte pas la localisation cellulaire d'E1, elle est également requise à la réplication (46).

BPV1 E1 est également régulée par phosphorylation par les cyclines/Cdk2 (35). Toutefois, l'impact de sa phosphorylation diffère de chez HPV E1. Chez BPV1, la phosphorylation n'est pas requise à la réplication *in vivo*. Néanmoins, elle affecte également la sous-localisation cellulaire d'E1. Contrairement à la phosphorylation d'HPV E1 qui favorise sa rétention nucléaire, la phosphorylation de la sérine 283 du DBD de BPV1 E1 par les kinases de la phase S favorise l'export nucléaire, ce qui a pour conséquence d'inhiber la réplication en contexte cellulaire (98). La phosphorylation de BPV1 E1 favoriserait donc l'export nucléaire d'E1 lors de la phase S et donc son continuel voyage entre le noyau et le cytoplasme, probablement dans le but de prévenir l'amplification du génome viral, qui est incompatible avec la maintien de l'épisome dans les premières couches cellulaires (98). Mentionnons enfin qu'outre les complexes cyclines/Cdk2 (144), BPV E1 est aussi phosphorylé par la caséine kinase II (151) et les protéines kinases A et C (260), du moins *in vitro* (132).

E1 est présente à de très bas niveaux lors de l'infection, étant souvent même indétectable. Sa production est faible, l'ARNm étant rarement épissé en faveur du cadre de lecture d'E1. Il semble également qu'E1 soit sujette à une dégradation plutôt rapide (145). Les expériences réalisées sur BPV1 E1 révèlent qu'E1 est modifiée par poly-ubiquitination et subséquemment dégradée par le protéasome (145). Cette ubiquitination est catalysée par l'APC/C (« anaphase promoting complex/cyclosome ») (152), un complexe E3 ubiquitine ligase qui régule la mitose et l'initiation de la réplication via la dégradation de protéines régulatrices telles les cyclines et cdc6 (revu dans (181, 207)).

Mentionnons enfin que BPV1, HPV1a, HPV16 et HPV18 E1 interagissent avec Ubc9 (184, 185, 257), une protéine de conjugaison de type E2 impliquée dans le transfert d'un groupement SUMO (small ubiquitin-like modifier) à un substrat, et que conformément, BPV1 E1 est sumoylé *in vivo* (184, 185). La sumoylation est une modification post-traductionnelle réversible qui régule divers processus cellulaires tels la réplication, le cycle cellulaire, et le trafic intracellulaire en affectant la localisation cellulaire, l'activité ou encore la stabilité de la protéine modifiée (revu dans (15)). L'impact de la sumoylation d'E1 n'est pas connu mais doit vraisemblablement influencer l'une de ces trois caractéristiques chez E1.

4.2.1.4. Mécanismes biochimiques d'initiation de la réplication

4.2.1.4.1. Liaison à l'origine de réplication

L'assemblage d'E1 à l'ori s'amorce par la liaison coopérative d'un homodimère d'E2 et de deux monomères d'E1, positionnés sur l'ADN à l'intérieur de deux sillons majeurs adjacents en position face-à-face (figure 12, p. 39) (63). Les sites de liaison d'E1 sont espacés de 3 pb, distance optimale pour l'interaction entre les DBD. Cette dimérisation d'E1 sur l'ADN augmente la spécificité et l'affinité de liaison d'E1 à ses sites et contribue par cette occasion à la stabilisation du complexe initial (235). Le DBD établit deux types de contacts avec l'ADN à partir de deux modules. Le premier module est une boucle qui établit un contact avec les trois

premières bases du site de liaison hexanucléique d'un brin d'ADN. Les interactions se font à la fois avec le squelette de désoxyribose phosphate de l'ADN et avec les bases nucléiques. Par son interaction avec certaines bases, ce module est donc responsable de la préférence d'E1 envers ses sites de liaison. Le second module de reconnaissance de l'ADN est constitué d'une hélice et d'une portion de boucle. Il interagit uniquement avec le squelette d'ADN du brin homologue et lie donc l'ADN de façon non spécifique. Aussi, à l'intérieur d'un DBD, chaque module interagit avec seulement un brin d'ADN et les deux modules contactent un brin différent de la double hélice (63). Ces divers types contacts établis entre le DBD et l'ADN expliquent bien la faible spécificité d'E1 envers ses séquences de liaison.

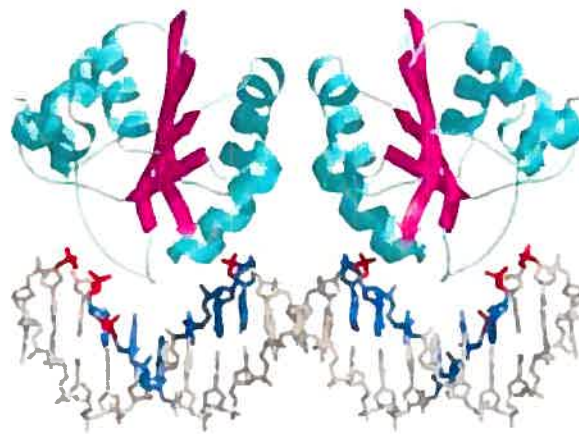


Figure 12 : Structure cristallographique d'un dimère de DBD d'E1 sur l'origine de réplication. Les deux DBD d'E1 sont liés sur l'ADN en position face-à-face, à l'intérieur de deux sillons majeurs adjacents. Chaque molécule de DBD effectue des contacts avec les deux brins d'ADN, une boucle contactant un brin et une hélice et une portion de boucle interagissant avec le second. Les séquences de liaison sont indiquées en bleu. (Enemark *et al.* (2002). EMBO J **21**:1487-96 (63))

Suite à la liaison sur l'ADN d'un premier dimère, deux molécules additionnelles d'E1 se fixent sur les deux autres sites. Elles sont positionnées de telle sorte que l'interaction spécifique avec les bases nucléiques établie par la boucle des DBD d'un dimère soient avec un brin différent du duplex d'ADN, qui est le même brin lié par le monomère de même orientation (figure 13, p.40) (63). Cet agencement des monomères sur l'ADN concorde avec un modèle d'assemblage où chaque hexamère encercle un brin différent d'ADN (1). La liaison du premier dimère de DBD produit déjà une légère distorsion de l'ADN, laquelle devient davantage prononcée lors de la liaison du second dimère (63). Ainsi, la liaison d'E1 sur ses sites produit un changement progressif et subtil dans la structure d'ADN, aboutissant en la séparation des brins lorsque le complexe est formé (25, 63, 197, 198).

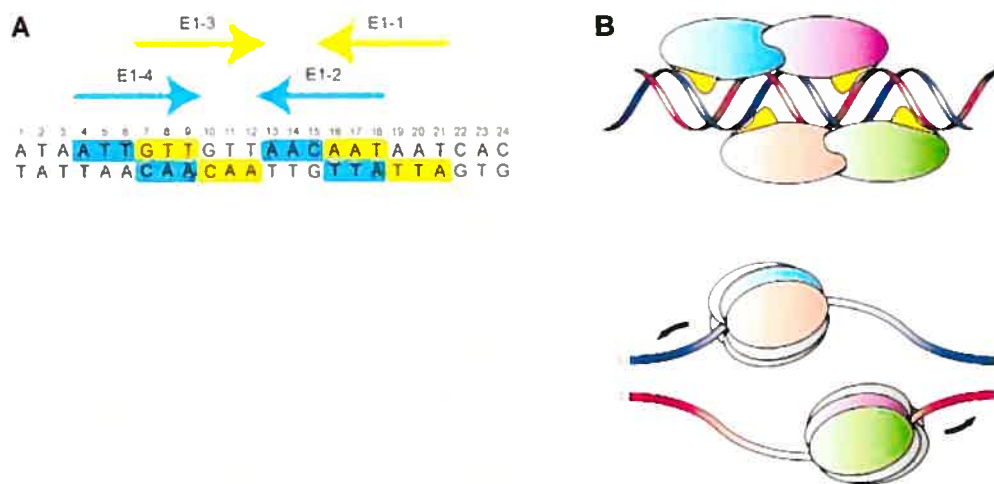


Figure 13 : Positionnement d'un tétramère d'E1 sur l'origine de réplication. A) Séquence de liaison de BPV1 E1 dans l'origine de réplication virale. Chaque monomère d'E1 contacte trois bases sur chacun des brins. Chaque site est représenté par les flèches et les séquences reconnues sont surlignées selon la couleur correspondante. B) Schéma où deux dimères d'E1 sont liés sur leur séquence respective. Les deux molécules à l'intérieur d'un dimère contactent un brin différent de la double hélice d'ADN, et les deux monomères de même orientation contactent le même brin. De cette façon, l'ajout subséquent de molécules d'E1 favorise l'assemblage de deux hexamères entourant chacun un brin d'ADN différent. (Enemark *et al.* (2002). EMBO J 21:1487-96 (63))

Lors du processus d'assemblage du double hexamère, E2 doit être relâché du complexe puisqu'il interagit avec E1 de telle sorte qu'il masque son domaine d'oligomérisation (1). Une boucle d'E1 forme en partie la surface d'interaction avec E2. Celle-ci semble bien positionnée, près du site de liaison du NTP, pour servir de commutateur dans la déstabilisation du complexe E1-E2 (93). Un processus allostérique où la liaison d'ATP (et non l'hydrolyse) relâche E2 du complexe est donc envisagé (1), conformément à l'observation que la liaison de l'ATP affaiblit l'interaction d'E1 avec E2 (250). Par la suite, des molécules additionnelles d'E1 s'ajoutent pour former un complexe intermédiaire de double trimères qui, en présence d'ATP hydrolysable, mène à la formation de double hexamères actifs pour le déroulement de l'ADN (199). Ainsi, la liaison coopérative d'E1 et E2 sur l'ADN génère un complexe de reconnaissance de l'ori de haute spécificité et permet l'assemblage d'un double hexamère de faible spécificité pour l'ADN mais sélectivement positionné.

4.2.1.4.2. Déroulement de l'ADN

Un mécanisme pour le déroulement de l'ADN par les hélicases AAA+ a récemment été proposé sur la base d'études cristallographiques (62). Le canal protéique formé par l'hélicase est fortement chargé positivement. Un seul des brins d'ADN passe à l'intérieur du canal, le second étant probablement détourné vers l'extérieur par exclusion stérique (125). Par analogie avec l'AgT de SV40 dont le domaine hélicase présente une forte homologie, une structure en épingle à cheveux (« β -hairpin ») du domaine hélicase générerait la première séparation des brins au niveau de l'origine, laquelle est essentielle à l'oligomérisation subséquente de l'hélicase autour d'un brin d'ADN (125). L'interaction des domaines hélicase avec l'ADN se produit au niveau de ces structures en épingles à cheveux qui pointent vers l'intérieur du canal, ces dernières étant agencées tel un escalier en colimaçon. Chaque structure en épingle interagit avec le squelette d'ADN d'un nucléotide et l'escorte à

travers le canal en fonction de la liaison et de l'hydrolyse d'ATP. L'hydrolyse de l'ATP a lieu dans les sous-unités situées en haut de l'escalier, alors que l'ADP est relâché en bas. Lors de la liaison de l'ATP, la sous-unité subit un changement de conformation qui la place en haut de l'escalier où elle contacte le phosphate de l'ADNsb du prochain nucléotide, qui commence ainsi son parcours à travers le canal. On peut imaginer une cascade d'événements où l'ATP est séquentiellement hydrolysé d'une sous-unité à l'autre, produisant une migration vers le bas de l'escalier et se répercutant par la translocation de nucléotides (62).

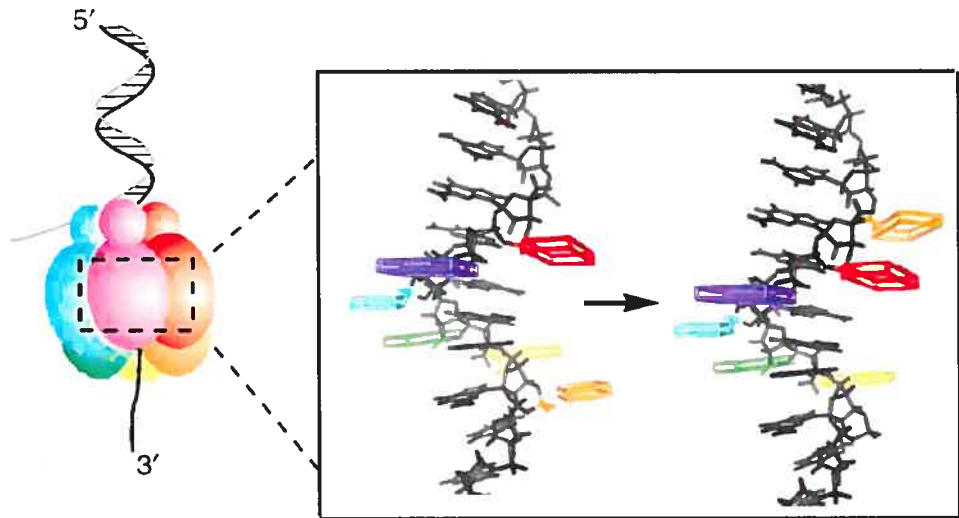


Figure 14 : Mécanisme de déroulement de l'ADN par E1. Un des brins d'ADN passe à l'intérieur du canal formé par l'hexamère alors que le second brin est dévié à l'extérieur. À l'intérieur du canal, les monomères contactent l'ADN à partir de structures en épingles à cheveux agencées en escalier en colimaçon. Les acides aminés spécifiques des différentes sous-unités sont illustrés selon la couleur correspondante. La position des acides aminés varie en fonction de la liaison et de l'hydrolyse d'ATP. Après la complétion d'un cycle et la relâche de l'ADNsb, l'épingle à cheveux au bas du canal (orange) retourne en haut de la spirale, où elle établit un contact avec le prochain nucléotide qu'elle escortera à travers le canal. (Raney KD (2006). Nat Struct Mol Biol **13**;671-2 (183))

4.2.1.5. Les partenaires d'interaction d'E1

Comme le virus dépend de la cellule hôte pour se répliquer, ses protéines doivent établir de multiples interactions avec les protéines cellulaires afin de modifier l'environnement de la cellule et s'approprier sa machinerie en faveur de sa propre réplication. Étant donné le rôle central d'E1 dans la réplication du génome viral, elle doit donc interagir avec plusieurs protéines cellulaires impliquées dans l'initiation et la régulation de la réplication. Des interactions avec de telles protéines ont déjà été reportées. Les interactions reliées à sa régulation, soit les kinases et la protéine Ubc9, ont été décrites à la section 4.2.1.2.

E1 interagit avec plusieurs facteurs de réplication cellulaires, d'ailleurs essentiels à la réplication de son génome, soit le complexe pol α /primase, RPA et la topo I. La pol α /primase interagit avec le domaine C-terminal d'E1 (4, 148). Ce domaine est également la région d'interaction d'E2 (237) et les deux protéines lient E1 de façon compétitive (4, 33, 148). Cette dernière observation semble suggérer une différence temporelle de leur interaction avec E1. E2 est impliqué dans les premières étapes d'assemblage de l'hexamère à l'origine mais ne fait pas partie du complexe hexamérique actif. C'est donc suite à l'assemblage que la pol α peut alors interagir avec E1 pour initier la réplication du brin retardé.

La découverte de l'interaction avec la topo I est récente et peu documentée, mais il semble que topo I interagisse avec deux régions d'E1, soit le DBD et l'extrémité C-terminale (aa 589-649) (99). Cette interaction stimulerait l'activité de la topo I (31) et favoriserait la liaison d'E1 sur l'origine de réplication (99).

RPA est un hétérotrimère dont les sous-unités font 70, 32 et 14 KDa. E1 interagit avec la sous-unité catalytique de 70 KDa (RPA70) (89). L'implication de l'interaction entre une protéine initiatrice et RPA dans l'initiation de la réplication est mieux documentée pour le SV40, dont l'AgT est une hélicase virale semblable à E1. L'AgT interagit également avec RPA70 et recrute ainsi RPA sur l'ADNsb. En présence d'une séquence simple brin de 8 nucléotides, il y a formation d'un complexe tertiaire AgT-RPA-ADNsb. Mais lorsque la séquence d'ADNsb s'allonge, l'hélicase

AgT est relâchée du complexe RPA-ADNsb. Ce mécanisme permet le couplage du déroulement de l'ADN avec le recrutement de RPA sur l'ADNsb généré (109). De façon intéressante, une inhibition de l'interaction entre E1 et RPA70 par l'ADNsb dépendamment de la longueur de l'oligonucléotide a également été observée (142).

Des interactions entre E1 et des protéines impliquées dans la structure de la chromatine ont également été décrites quoique peu documentées. Le domaine N-terminal d'E1 a été démontré pour interagir avec l'histone H1, histone reliant les différents nucléosomes ensemble pour la compaction de l'ADN, cette interaction résultant au délogement de l'histone H1 de sur l'ADN (225). Un composant du complexe SWI/SNF de remodelage de la chromatine, Ini1/hSNF5, interagit également directement avec E1 et est important pour la réplication de l'ADN viral (129). E1 pourrait donc favoriser la réplication du génome viral en agissant sur l'accessibilité de l'ADN.

De plus, des interactions avec les chaperonnes moléculaires Hsp70 et Hsp40 ont été décrites et pourraient être impliquées dans la liaison de E1 sur l'origine et l'assemblage en hexamères actifs (135, 136). Enfin, E1 interagit avec E1-BP, une protéine de fonction inconnue possédant un motif ATPase. Cette interaction semble requise pour une réplication optimale de l'ADN viral (257).

Bien que plusieurs partenaires d'interaction de l'hélicase E1 soient déjà connus, la présence de motifs conservés chez E1 des différents PV laisse présager que certaines interactions/fonctions d'E1 restent à élucider. La prochaine section s'intéresse aux outils expérimentaux permettant l'identification de nouveaux partenaires d'interactions.

5. IDENTIFICATION DE PARTENAIRES PROTÉIQUES

L'ère scientifique de la génomique a abouti au séquençage du génome humain en entier en 2004. La surprise fut alors la quantité de gènes constituant le génome humain, moins nombreux qu'estimé initialement. Il apparaissait alors que la complexité des organismes évolués repose davantage sur la fine régulation de l'expression des gènes et des interactions protéiques que sur la diversité des protéines exprimées. Les protéines interagissent constamment entre elles, et ces différentes interactions sont impliquées dans toutes les fonctions cellulaires, leur altération ou dérégulation étant une source de maladies. C'est ainsi que les chercheurs se sont donné le nouveau défi de disséquer les réseaux d'interactions protéiques, d'où la nécessité d'avoir de bons outils pour étudier les interactions protéiques. Cette section discute des méthodes permettant d'identifier les partenaires d'interaction d'une protéine d'intérêt, discutant des points forts et désavantages des différentes méthodes.

5.1. Méthodes par criblage de banques d'ADN complémentaires (ADNc)

Un moyen d'identifier de nouveaux partenaires protéiques est de tester l'interaction d'une protéine d'intérêt avec une multitude de protéines. Dans cette optique, des banques regroupant les séquences codantes des protéines (ADNc) sont disponibles. Par la suite, différents outils permettent de visualiser si une interaction est possible entre la protéine d'intérêt et les protéines de la librairie. Elles permettent ainsi de tester rapidement et à large échelle une grande variété de protéines pour leur interaction potentielle avec une protéine d'intérêt. Il s'agit toutefois d'une méthode *in vitro*, avec les inconvénients qui s'ensuivent. Tout d'abord, l'étude d'une interaction en dehors du contexte physiologique peut générer de nombreux faux-positifs, d'où la nécessité de confirmer les résultats positifs par d'autres méthodes. Ensuite, les protéines n'étant généralement pas produites dans leur organisme d'origine, elles peuvent présenter un mauvais repliement ou manquer certaines modifications post-traductionnelles nécessaires à une interaction.

5.1.1. La librairie de phages

Une des approches mettant à profit les banques d'ADNc est la librairie de phages. Une banque d'ADNc est exprimée en fusion avec une protéine de la capsid de d'un bactériophage de telle sorte que lors de l'assemblage des phages, les diverses protéines sont exposées à leur surface des virus. La protéine d'intérêt est fixée à un support à laquelle on ajoute la librairie de phages. Suite aux lavages, les phages qui demeurent accolés au support sont ceux dont la protéine de surface interagit avec la protéine d'intérêt. Plusieurs passages de phages sur la protéine immobilisée sont alors effectués afin d'enrichir la population de phages d'intérêts. Cette technique permet d'étudier les interactions directes.

5.1.2. Les systèmes deux-hybrides

Alternativement, l'interaction entre deux protéines peut être criblée dans un contexte cellulaire à l'aide d'un système deux-hybrides. La stratégie repose sur l'utilisation d'un facteur de transcription dont la reconstitution permet l'activation de la transcription d'un gène reporteur. Le succès de ce système dépend donc de l'utilisation d'un facteur de transcription modulaire, c'est-à-dire dont les domaines de liaison à l'ADN (DBD) et de transactivation sont fonctionnels lorsqu'isolés. De plus, la proximité des domaines et non leur liaison directe doit être suffisante à l'activité de transactivation. La protéine d'intérêt est donc fusionnée au DBD, et une banque d'ADNc est fusionnée au domaine transactivateur. L'interaction entre la protéine d'intérêt et une protéine de la banque provoque le rapprochement des deux domaines du facteur de transcription, et l'interaction est détectée grâce à un gène rapporteur qui est sous le contrôle du facteur de transcription. L'avantage de cette technique est qu'elle est réalisable à grande échelle. Toutefois, elle peut générer des faux-positifs et des faux négatifs car (i) la surexpression de protéines peut mener à des interactions non-spécifiques, (ii) la fusion peut affecter la protéine, (iii) les protéines étant généralement exprimées dans un système hétérologue (généralement de levure), elles

ne possèdent peut-être pas les modifications post-traductionnelles requises et (iv), les protéines ne sont peut-être pas normalement exprimées en même temps ou dans le même compartiment cellulaire. La version la plus populaire utilise le facteur de transcription Gal4 et est effectuée avec des levures. Plusieurs variantes sont également disponibles, pour le criblage dans des cellules bactériennes ou de mammifères (permet l'étude des interactions nécessitant certaines modifications post-traductionnelles ou des protéines qui ne se replient pas adéquatement dans des levures), ou encore des systèmes utilisant une protéine de fusion autre qu'un facteur de transcription, notamment pour la détection d'interactions de protéines membranaires (211) (revu dans (77)).

5.1.3. La complémentation de fragments protéiques

Dans la même lignée que le système deux hybrides, la complémentation de fragments protéiques (PCA) permet de détecter des interactions protéiques dans le compartiment cellulaire approprié. Cette méthode repose également sur le criblage d'une banque d'ADNc fusionnés à un domaine protéique dont la partie complémentaire est fusionnée à la protéine d'intérêt, sauf que l'interaction entre deux protéines, plutôt qu'activer la transcription d'un gène rapporteur, reconstitue un enzyme dont l'activité sert d'indicateur. Encore un fois, différentes protéines de fusion peuvent être utilisées. Par exemple, un tel système de criblage a été développé à partir de la dihydrofolate réductase murine (DHFR). Cet enzyme catalyse la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate requis pour la biosynthèse de la sérine, la méthionine, des purines et du thymidylate. Cet enzyme est donc essentiel à la survie cellulaire. Les deux fragments de la DHFR sont exprimés en fusion soit avec la protéine d'intérêt, soit avec une banque d'ADNc dans des cellules dont le gène DHFR est inactivé. La survie cellulaire en absence de nucléotides dépend alors de la reconstitution de la DHFR conditionnelle à l'interaction des protéines de fusions. La survie cellulaire indique donc une interaction. On peut par la suite quantifier et localiser l'interaction par l'utilisation de méthotrexate conjugué à la fluorescéine

(fMTX). Ce dernier lie le DHFR reconstitué dans un ratio 1:1, alors que le fMTX non lié est activement et rapidement exporté de la cellule. Le nombre de molécules fMTX retenues dans les cellules indique la quantité de complexes formés, et la localisation cellulaire peut ensuite être observée par microscopie grâce à la fluorescéine. En plus de permettre l'identification d'interactions entre protéines, la complémentation de fragments protéiques utilisant la DHFR permet également de quantifier et de visualiser l'interaction *in vivo* par microscopie à fluorescence. De plus, cette technique permet d'étudier des interactions qui ne sont pas constitutives, qui se produisent par exemple en réponse à un signal hormonal (187, 188).

5.2. Purification de complexes protéiques

Une seconde stratégie pour l'identification de partenaires d'interaction est de purifier la protéine d'intérêt dans des conditions préservant les interactions et d'identifier les protéines co-purifiées. Le développement de la spectrométrie de masse (MS) a grandement favorisé l'utilisation de cette stratégie. La MS est un outil puissant et sensible pour l'identification de protéines en fonction de leur masse et de leur charge. L'utilisation du MS a d'abord été limitée par la difficulté d'ioniser et transférer les biomolécules en phase gazeuse, étape requise à l'analyse par MS. Le développement des méthodes d'ionisation par MALDI (« matrix-assisted laser desorption ionization ») et électrospray à la fin des années 80 sont à la base d'un outil puissant désormais adapté aux études protéomiques (68, 114). De plus, le développement au début des années 90 des premiers algorithmes corrélant les données de MS aux séquences protéiques des banques de données a contribué à l'utilisation du MS pour des études à grandes échelles (146). Ainsi, le perfectionnement de la MS coïncide avec la popularisation de la protéomique, faisant de cette approche une technologie centrale. L'identification de protéines par MS peut ainsi être jumelée à différentes techniques de purification de complexes protéiques, notamment à la purification par chromatographie d'affinité, qui est beaucoup plus simple, rapide et efficace que les méthodes biochimiques traditionnelles.

Différents peptides de fusions sont aujourd'hui disponibles pour la chromatographie d'affinité, allant de protéines connues aux peptides synthétiques. Par exemple, les peptides synthétiques FLAG ou Xpress, pour lesquels des anticorps de haute affinité ont été développés, la fusion à 6 histidines pour la purification sur colonnes de nickel ou encore à la glutathionne-S-transférase (GST) sont fréquemment utilisés. La GST est particulièrement intéressante car elle accroît souvent la solubilité de la protéine fusionnée, est non-toxique et possède une affinité élevée pour la glutathionne, sont substrat naturel. Elle convient donc bien à l'expression et la purification de grandes quantités de protéines de fusion via l'utilisation de billes couplées à la glutathionne. La fusion GST est couramment utilisée pour l'isolement de complexes protéiques par « GST pulldown », où la protéine d'intérêt est immobilisée sur une matrice de glutathionne-sépharose à laquelle on ajoute de l'extrait cellulaire. Suite aux lavages, les protéines retenues sont celles qui interagissent avec la protéine cible. La protéine cible et les protéines associées peuvent par la suite être éluées par l'ajout de glutathionne réduite qui compétitionne avec la matrice pour l'interaction avec la GST.

L'immunoprécipitation est une autre chromatographie d'affinité permettant d'isoler des complexes protéiques. Dans ce cas-ci, l'extrait cellulaire est incubé avec un anticorps contre la protéine d'intérêt ou contre un marqueur qui lui est fusionné. La protéine et les protéines associées sont par la suite précipitées par des billes liées à la protéine A ou G, qui ont la propriété de lier la partie Fc des anticorps. Ces différentes méthodes sont rapides, mais peuvent générer des faux positifs. De plus, elles ne permettent pas d'identifier des interactions transitoires.

Pour augmenter la pureté des complexes purifiés, il est avantageux de combiner deux étapes de chromatographie d'affinité (TAP pour « tandem affinity purification »). Un exemple utilisant le domaine de la protéine A de *Staphylococcus aureus* liant la région Fc des anticorps et un peptide liant la calmoduline est présenté à la figure 15 (p. 52). Une première chromatographie utilise des billes conjuguées à des immunoglobulines de type G (IgG) et permet de retenir la protéine d'intérêt et ses

partenaires grâce au peptide protéine A de la fusion. Suite aux lavages, les complexes sont relâchés par l'action de la protéase TEV (« tobacco etch virus »), pour laquelle un site est inséré entre les deux peptides du « tag ». La seconde chromatographie utilise des billes conjuguées à la calmoduline qui lie la seconde partie du « tag » en présence de calcium. L'élution finale peut donc être réalisée par chélation du calcium. Ces deux étapes de purification étant réalisées dans des conditions physiologiques, elles permettent l'isolement de complexes fonctionnels, préservant les interactions et l'intégrité des protéines du complexe.

En combinant deux étapes de chromatographies de haute affinité, le TAP permet la purification efficace de complexes protéiques de bonne pureté, la rendant utilisable pour la purification de complexes dans des systèmes qui ne sont pas en surexpression. En ce sens, le TAP peut être combiné à un système d'induction de la protéine d'intérêt qui contrôle son niveau d'expression, évitant les interactions non spécifiques qui peuvent survenir dans les systèmes en surexpression. On peut notamment utiliser des systèmes d'induction utilisant la tétracycline ou encore l'ecdysone. Ce dernier, moins connu, utilise l'hormone stéroïdienne ecdysone qui circule librement à travers les membranes pour se fixer sur son récepteur nucléaire. Dépendamment à la liaison de l'hormone, le récepteur dimérise puis subit une translocation sur l'ADN où il agit en tant que facteur de transcription activant l'expression des gènes sous le contrôle de promoteurs contenant sa séquence de liaison. Ce système d'induction profite de la bonne pénétration cellulaire de l'hormone lipophile et de sa courte demi-vie, permettant une induction précise et efficace. Le système d'induction à l'ecdysone produit une activité basale inférieure au système utilisant la tétracycline (avantageux pour l'étude de protéines toxiques pour la cellule) ainsi qu'un meilleur contrôle de l'induction (170). Elle est toutefois plus coûteuse.

La purification par TAP permettant l'isolation de complexes dans des conditions se voulant physiologiques, elle a l'avantage de mener à l'identification de relativement peu de faux négatifs et probablement peu de faux positifs (60, 115). L'inconvénient, qui est vrai pour la plupart des chromatographies, est que la protéine doit être fusionnée à un « tag », celui-ci pouvant potentiellement influencer la protéine et donc la composition du complexe. Toutefois, les expériences réalisées indiquent que l'addition du « tag » ne semble généralement pas avoir d'effet majeur (59, 83). Aussi, la méthode ne permet pas à la base de distinguer entre les interactions directes ou indirectes à l'intérieur du complexe, ou encore de discerner la présence de sous-complexes. Toutefois, des variantes sont disponibles pour répondre à ces questions. On peut d'abord analyser les complexes purifiés en maintenant les interactions non covalentes à l'intérieur du spectromètre de masse (208), puis recommencer l'analyse après avoir déstabilisé les complexes en sous-complexes et ainsi construire une carte d'interaction à l'intérieur du complexe (92). Il est aussi utile de refaire la purification en marquant les différentes protéines identifiées dans le complexe afin de vérifier les composantes du premier complexe qui se retrouvent dans les nouveaux complexes ainsi que l'apparition de nouvelles sous-unités. Ces données permettent alors de définir des réseaux d'interactions entre complexes et sous-complexes.

Le projet présenté concerne l'identification des partenaires protéiques cellulaires de l'hélicase virale E1 d'HPV11. Étant donné les avantages discutés précédemment, on a opté pour la purification de complexes par TAP suite à l'expression de la protéine sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'ecdysone.

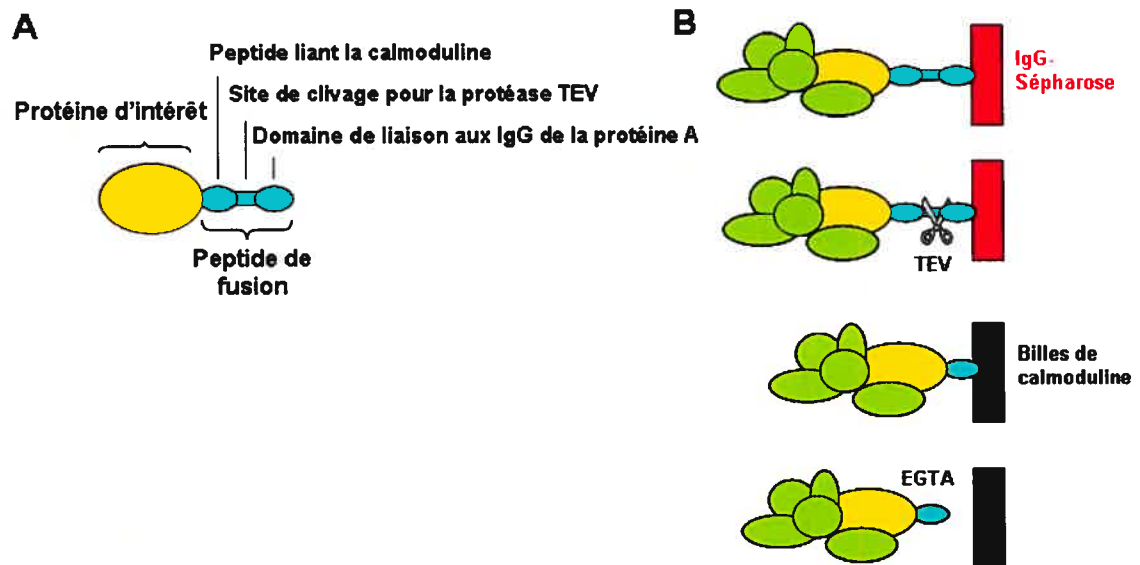


Figure 15 : Purification de complexes protéiques par double chromatographie d'affinité. A) Schéma du marqueur fusionné à la protéine d'intérêt. Il est constitué de la portion de la protéine A de *S. aureus* qui lie les IgG et d'un peptide liant la calmoduline, les deux peptides étant séparés par un site de clivage pour la protéase TEV. B) La première étape de purification fait intervenir des billes conjuguées à des IgG, qui retiennent les complexes via l'interaction du peptide de la protéine A. Suite aux lavages, les complexes sont élués par l'action de la protéase TEV. La seconde étape de purification utilise des billes liées à la calmoduline qui, en présence de calcium, interagissent avec le peptide du marqueur. Suite aux lavages, la chélation du calcium par l'EGTA permet l'élution finale des complexes. (D'après Puig *et al.* (2001). *Methods* **24**;218-229 (182))

6. HYPOTHÈSE ET OBJECTIF

Les HPV possèdent un petit génome qui encode un nombre restreint de protéines virales. Ces virus dépendent donc grandement de la machinerie de la cellule-hôte pour l'accomplissement de leur cycle répliatif. Ainsi, la plupart de leurs protéines virales sont multifonctionnelles et assurent leurs diverses fonctions via l'établissement de multiples interactions avec les protéines cellulaires.

Plusieurs partenaires d'interaction ont déjà été décrits pour la protéine virale E1 (revus à la section 4.2.1.5, p. 43). E1 est la protéine la mieux conservée entre les PV, ce qui reflète bien son rôle fondamental dans le cycle viral. Aussi, considérant la présence de séquences protéiques d'E1 hautement conservées entre les divers types de HPV pour lesquelles aucune fonction n'est encore assignée à ce jour, on a émis l'hypothèse que d'autres partenaires d'interaction cellulaires sont impliqués dans les diverses fonctions d'E1. L'objectif était donc d'identifier les protéines cellulaires interagissant directement ou indirectement avec E1 par la purification des complexes cellulaires dans le(s)quel(s) se retrouve E1 et l'identification subséquente des protéines présentes dans ce(s) complexe(s), pour éventuellement déterminer l'impact des diverses interactions identifiées sur les fonctions d'E1 et la pathogénèse des HPV.

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Alexandra Côté-Martin
M.Sc. biochimie 2-465-1-0 : Virologie moléculaire
Département de biochimie / Faculté de médecine / Université de Montréal

2. Description de l'article

Alexandra Côté-Martin, Cary Moody, Amélie Fradet-Turcotte, Simon Joubert, Guy G. Poirier, Benoit Coulombe, Laimonis A. Laimins and Jacques Archambault. **Identification of the WD Repeat Protein p80 as a Novel Cellular Target of the Human Papillomavirus E1 Helicase**
En phase finale de préparation, pour soumission à « Journal of Virology ».

3. Déclaration de tous les coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Alexandra Côté-Martin** inclue cet article dans son **mémoire de maîtrise** qui a pour titre « **Identification des partenaires protéiques de l'hélicase virale E1 du virus du papillome humain : caractérisation d'une nouvelle interaction avec la protéine à domaines WD p80** ».

Amélie Fradet-Turcotte
Coauteur

3 avr 07
Date

SIMON JOUBERT
Coauteur

03-04-2007
Date

JACQUES ARCHAMBAULT
Coauteur

03- Avril -2007
Date

BENOIT COULOMBE
Coauteur

03-04-07
Date

Signature

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Alexandra Côté-Martin
M.Sc. biochimie 2-465-1-0 : Virologie moléculaire
Département de biochimie / Faculté de médecine / Université de Montréal

2. Description de l'article

Alexandra Côté-Martin, Cary Moody, Amélie Fradet-Turcotte, Simon Joubert, Guy G. Poirier, Benoit Coulombe, Laimonis A. Laimins and Jacques Archambault. **Identification of the WD Repeat Protein p80 as a Novel Cellular Target of the Human Papillomavirus E1 Helicase**
En phase finale de préparation, pour soumission à « Journal of Virology ».

3. Déclaration de tous les coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Alexandra Côté-Martin** inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « **Identification des partenaires protéiques de l'hélicase virale E1 du virus du papillome humain : caractérisation d'une nouvelle interaction avec la protéine à domaines WD p80** ».

LAIMONIS LAIMINS		4/11/07
Coauteur		Date
		4/11/07
	Signature	Date

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Alexandra Côté-Martin
M.Sc. biochimie 2-465-1-0 : Virologie moléculaire
Département de biochimie / Faculté de médecine / Université de Montréal

2. Description de l'article

Alexandra Côté-Martin, Cary Moody, Amélie Fradet-Turcotte, Simon Joubert, Guy G. Poirier, Benoit Coulombe, Laimonis A. Laimins and Jacques Archambault. **Identification of the WD Repeat Protein p80 as a Novel Cellular Target of the Human Papillomavirus E1 Helicase**
En phase finale de préparation, pour soumission à « Journal of Virology ».

3. Déclaration de tous les coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Alexandra Côté-Martin** inclue cet article dans son **mémoire de maîtrise** qui a pour titre « **Identification des partenaires protéiques de l'hélicase virale E1 du virus du papillome humain : caractérisation d'une nouvelle interaction avec la protéine à domaines WD p80** ».

<u>Claudia D'Abramo</u>		<u>31-07-07</u>
Coauteur		Date
<u>Michael Lehoux</u>		<u>01-08-07</u>
Coauteur		Date

Signature

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Alexandra Côté-Martin
M.Sc. biochimie 2-465-1-0 : Virologie moléculaire
Département de biochimie / Faculté de médecine / Université de Montréal

2. Description de l'article

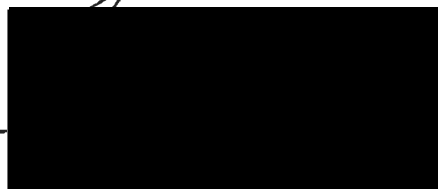
Alexandra Côté-Martin, Cary Moody, Amélie Fradet-Turcotte, Simon Joubert, Guy G. Poirier, Benoit Coulombe, Laimonis A. Laimins and Jacques Archambault. **Identification of the WD Repeat Protein p80 as a Novel Cellular Target of the Human Papillomavirus E1 Helicase**
En phase finale de préparation, pour soumission à « Journal of Virology ».

3. Déclaration de tous les coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Alexandra Côté-Martin** inclue cet article dans son **mémoire de maîtrise** qui a pour titre « **Identification des partenaires protéiques de l'hélicase virale E1 du virus du papillome humain : caractérisation d'une nouvelle interaction avec la protéine à domaines WD p80** ».

Guy G Poirier, PhD

Coauteur



10 April 2008
Date

Coauteur

Signature

Date

CONTRIBUTION DES AUTEURS À L'ARTICLE

Titre de l'article : The Human Papillomavirus E1 Helicase Interacts with the WD Repeat Protein p80 to Promote Maintenance of the Viral Genome in Keratinocytes

Auteurs : Alexandra Côté-Martin, Cary Moody, Amélie Fradet-Turcotte, Claudia M. D'Abramo, Michaël Lehoux, Simon Joubert, Guy G. Poirier, Benoit Coulombe, Laimonis A. Laimins and Jacques Archambault.

Soumis à : Journal of Virology

L'article concerne la découverte d'une nouvelle interaction protéique entre la protéine cellulaire p80 et l'hélicase virale E1 des virus du papillome humain (HPV) infectant les muqueuses génitales. La nouvelle interaction a été découverte suite à l'isolement des complexes protéiques associés à HPV11 E1 par deux étapes de chromatographie d'affinité effectuées à partir de lignées stables inducibles. Les protéines purifiées ont été identifiées par spectrométrie de masse MS/MS. L'interaction avec p80 ainsi découverte a par la suite été confirmée par co-immunoprécipitation. La zone d'interaction de p80 sur E1 a été délimitée par « GST pulldown », information qui a par la suite servi à l'identification de mutants d'E1 ne liant plus p80. Enfin, il a été déterminé en microscopie que p80 co-localise au noyau avec E1 dépendamment de leur interaction, et que l'abrogation de l'interaction affecte la fonction d'E1 concernant le maintien des épisomes viraux dans les kératinocytes non différenciés mais n'a pas d'effet majeur sur sa capacité d'amplifier l'ADN viral suite à la différenciation des kératinocytes.

Contributions des auteurs :

Cary Moody effectue un post-doctorat dans le laboratoire du Dr L.A. Laimins à l'université de Northwestern à Chicago. Elle a réalisée l'expérience de réplication transitoire ainsi que les expériences dans les kératinocytes primaires, c'est-à-dire le maintien des génomes dans les kératinocytes non différenciés et les tests d'amplification des génomes viraux en milieu de méthylcellulose.

Amélie Fradet-Turcotte est une étudiante au doctorat. Elle a contribué aux expériences d'identification de la région d'interaction de p80 sur E1 et d'accumulation cellulaire des différentes protéines E1 (figure 4 et 8 de l'article).

Claudia D'Abramo fait présentement son post-doctorat. Elle a effectué l'expérience de microscopie pour la co-localisation de p80 avec E1 dont la SLN est inactivée.

Michaël Lehoux est un étudiant à la maîtrise. Il a confirmé l'interaction d'E1 et p80 en GST pulldown dans les lignées cellulaires C33A et HeLa.

Le Dr G. Poirier est responsable du service de spectrométrie de masse au Centre Protéomique de l'Est du Québec. C'est son équipe qui a procédé à l'identification des protéines purifiées.

Le Dr S. Joubert effectue un post-doctorat. Il m'a aidé pour la rédaction de l'article.

Le Dr J. Archambault et le Dr B. Coulombe, en tant que directeur et co-directeur respectifs de mes travaux de recherches, ont contribué financièrement ainsi qu'intellectuellement aux travaux présentés.

En tant qu'auteure principale, j'ai effectué la majorité des expériences présentées dans l'article. J'ai établi les lignées stables en vue de la purification et effectué l'isolation des complexes protéiques par TAP. Tel que mentionné précédemment, l'identification de la zone d'interaction s'est faite par la suite en collaboration avec Amélie Fradet-Turcotte. J'ai aussi réalisé les expériences de co-immunoprécipitation, les études de microscopie pour la localisation intracellulaire, participé à la vérification de l'interaction de p80 avec les protéines E1 de divers PV avec l'aide d'un stagiaire d'été, et ai effectué la mutagenèse dirigée pour l'abolition de la liaison de p80 et les expériences utilisant ces mutants, en excluant les expériences réalisées dans les kératinocytes primaires.

The Human Papillomavirus E1 Helicase Interacts with the WD Repeat Protein p80 to Promote Maintenance of the Viral Genome in Keratinocytes

Alexandra Côté-Martin^{1,2}, Cary Moody³, Amélie Fradet-Turcotte^{1,2}, Claudia M. D'Abramo¹, Michaël Lehoux^{1,2}, Simon Joubert¹, Guy G. Poirier⁴, Benoît Coulombe^{2,5}, Laimonis A. Laimins³ and Jacques Archambault^{1,2} *

¹ Laboratory of Molecular Virology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Pine Avenue West, Montreal, Quebec, Canada, H2W 1R7

² Department of Biochemistry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

³ Department of Microbiology-Immunology, The Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, Illinois 60611, USA

⁴ Health and Environment Unit and Eastern Quebec Proteomics Center, Faculty of Medicine, Laval University Medical Research Center, 2705 Boulevard Laurier, Ste-Foy, Quebec, Canada G1V 4G2

⁵ Laboratory of Gene Transcription and Proteomics Discovery Platform, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Pine Avenue West, Montréal, Québec, Canada, H2W 1R7

Corresponding author: Laboratory of Molecular Virology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Pine Avenue West, Montreal, Quebec, Canada, H2W 1R7, Tel: (514) 987-5739; Fax: (514) 987-5741; E-mail:

|| [REDACTED]

Running Title: Interaction of HPV E1 with p80

ABSTRACT

Due to the limited coding capacity of their small genome, human papillomaviruses (HPV) rely extensively on host factors for completion of their life cycle. Accordingly, most HPV proteins, including the replicative helicase E1, engage in multiple protein interactions. The fact that conserved regions of E1 have not yet been ascribed a function prompted us to use tandem affinity purification (TAP) coupled to mass spectrometry to identify novel targets of this helicase. This led to the discovery of a novel interaction between the N-terminal 40 amino acids of HPV11 E1 and the cellular WD repeat protein p80 (WDR48). We found that interaction with p80 is conserved among E1 from anogenital HPV but not cutaneous or animal types. Co-localization studies showed that E1 can redistribute p80 from the cytoplasm to the nucleus in a manner that is dependent on the E1 nuclear localization signal. Three amino acid substitutions in E1 from HPV types 11 and 31 were identified that abrogate binding to p80 and its re-localization to the nucleus. In HPV31 E1, these substitutions reduced but did not completely abolish transient viral DNA replication. HPV31 genomes encoding two of the mutant E1 were not maintained as episomes in immortalized primary keratinocytes whereas one encoding the third mutant protein was maintained at a very low copy number. These findings suggest that the interaction of E1 with p80 is required for efficient maintenance of the viral episome in undifferentiated keratinocytes.

INTRODUCTION

Papillomaviruses (PV) are small, non-enveloped double-stranded DNA viruses that induce hyperproliferative lesions of cutaneous and mucosal stratified squamous epithelia. They can infect the majority of higher vertebrates, with humans

being the host for more than 100 different HPV types. Based on oncogenic propensity, HPV types that infect the anogenital region are categorized as either low-risk types, such as HPV6 and 11, which cause genital warts, or high-risk types, like HPV16, 18 and 31, which induce dysplastic lesions that can progress to cancer. The viral replication cycle is tightly linked to the differentiation program of stratified epithelia, the expression of viral proteins being modulated by intracellular changes occurring as cells differentiate toward the upper layers of the epithelium. The viral replication cycle begins with the infection of an undifferentiated basal cell in which the viral genome is established as an extrachromosomal episome in the nucleus at 50-100 copies, a number that is maintained until infected keratinocytes reach the upper cell layers (reviewed in (15)). In those differentiated cells, the viral genome is amplified to a high copy number, probably as a result of increased expression of the viral replicative helicase E1, brought about by differentiation-dependant activation of the late promoter (20, 37). The viral structural proteins, which are also expressed from the late promoter, are produced in the upper layers of the epithelium where the viral cycle is completed by encapsidation of the viral genome and release of newly assembled infectious virions.

In addition to the cellular DNA replication machinery, only two virally encoded proteins, E1 and E2, are required for viral DNA replication (5, 22, 57, 60). E2 is a sequence-dependent DNA binding protein that recognizes specific sequences in the viral origin of replication (ori). E2 also directly interacts with E1 to help recruit it to the origin. E1, the most conserved protein among PV and the only one with enzymatic activity, belongs to helicase superfamily 3 (21). Although this initiator protein is recruited to the ori in its monomeric form, it must assemble into a double hexamer to unwind DNA ahead of the bidirectional replication fork (reviewed in (50)).

E1 is comprised of three functional domains. The C-terminal domain possesses the helicase/ATPase activity and includes sequences involved in oligomerization of the protein (55). The central portion of the protein contains the

origin binding domain (OBD) that recognizes distinct sequences in the ori, albeit with low affinity and moderate sequence specificity (49, 54, 55). Not surprisingly, both the OBD and helicase domain are required for DNA replication in vitro and in vivo (1). In contrast to these two domains, the N-terminal portion of E1 is required for viral genome replication only in vivo but not in vitro (12, 51), thus suggesting that it has a regulatory function. Accordingly, the N-terminal domain has been shown to contain functional nuclear localization and export sequences, a conserved cyclin-binding motif (CBM) needed for interaction with cyclin A/E-Cdk2 and several phosphorylation sites for this kinase and others (10, 24).

In agreement with its central role in viral DNA replication, E1 has been reported to interact with several cellular replication factors. These include the polymerase α -primase complex, which synthesizes the RNA primer essential for lagging strand synthesis and which is recruited to the viral replication fork through its association with the C-terminal helicase domain of E1 (1, 7, 33, 56), the single-stranded DNA binding protein replication protein A (RPA) (14, 30) and topoisomerase I (Topo I). Interaction of E1 with Topo I increases both the activity of Topo I, needed for releasing the stress torsion generated by DNA unwinding, and the binding of E1 to ori (6, 17). The molecular chaperones Hsp40 and Hsp70 have also been found to promote binding of E1 to ori as well as its subsequent assembly into active double hexamers (28, 29).

A number of studies have shown that E1 is post-translationally modified, in particular by phosphorylation on several residues and by different kinases (8, 10, 25, 31). BPV and HPV E1 have been shown to bind to the cell cycle regulatory kinase complexes cyclin A/E-Cdk2 through a highly conserved CBM in the N-terminal region of the protein (8, 16, 27, 31). Phosphorylation by Cdk2 of specific serine residues in the N-terminal region of HPV11 E1 abrogates its nuclear export, thus promoting its nuclear accumulation (10, 16). In addition, BPV E1 can be phosphorylated on several other residues by casein kinase II (34) and protein kinase

A and C (63), at least in vitro. E1 is also subject to other post-translational modifications. E1 from BPV and HPV18 has been reported to associate with Ubc9, a SUMO-conjugating enzyme, and can be sumoylated in vitro and in vivo (41, 42, 61, 62). Although the exact consequences of E1 sumoylation are still unclear, one may speculate by analogy with other systems (reviewed in (3)) that it could affect the stability, activity or sub-cellular localization of the protein. BPV E1 has also been shown to be poly-ubiquitinated, a modification that triggers its degradation by the proteasome (32). Ubiquitination of E1 is promoted by the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) (35), a multisubunit E3 ubiquitin ligase that regulates mitosis by triggering the degradation of regulatory proteins such as cyclins (reviewed in (40)). Accordingly, BPV E1 contains a destruction box (35), a motif found in many APC/C substrates that is required for their ubiquitination by this E3 ligase (59). Collectively, these findings point to E1 being highly regulated by association with different post-translational modifying enzymes.

In addition to replication factors and regulatory proteins, E1 has also been reported to interact with two proteins that could favor replication by modifying chromatin structure: histone H1, that binds nucleosome-organized chromatin to create an ordered, more compact DNA structure and which is dislodged from DNA upon its interaction with E1 (52), and Ini1/SNF5 (23), a subunit of the SWI/SNF chromatin remodelling complex. Finally, E1 also interacts with E1-BP, a putative ATPase of unknown function (62). Mutations in E1 that prevent its association with E1-BP are unable to support viral DNA replication, suggesting a role for E1-BP in this process (62).

Small DNA tumor viruses including PV encode only a few proteins and thus must rely extensively on the infected cell proteome for completion of their life cycle. Accordingly, most papilloma proteins are multifunctional and have been shown to engage in multiple protein interactions with cellular factors to carry out their functions. The fact that highly conserved regions of E1 have not yet been ascribed a function provides a rationale for thinking that novel cellular targets of this helicase

remain to be discovered. We have used a tandem affinity purification (TAP) approach to identify novel functions and interaction partners of E1. We report here that the WD repeat protein p80 associates with the N-terminal portion of E1 from low- and high-risk anogenital HPV types and that this interaction is required for efficient maintenance of the viral episome in undifferentiated primary human keratinocytes.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructions and mutagenesis. The Xpress-p80 expression vector was a kind gift from Dr. Jae U. Jung (Harvard University, Boston) and has been described (39). All HPV11 E1 sequences used in this study contained the previously reported mutations inactivating the major splicing site (9). The corresponding splicing site in HPV31 E1 was also inactivated using two silent mutations (GCA GGT → GCT GGC) since Western blot and microscopy data suggested that EYFP-fused HPV31 E1 was produced as a spliced, truncated form in cells. Proper expression of full length, splice site mutated HPV31 E1 was confirmed by Western blot analysis and its nuclear localization confirmed by confocal microscopy (data not shown). (i) *TAP fusions.* HPV11 E1 sequences were amplified by PCR and cloned into the vector pMzi (43) between the XhoI and NotI sites. For the TAP-HPV11 E1(353-649) construct, the SV40 nuclear localization signal sequence (5'-CCG AAG AAG AAA AGG AAG GTG-3') was also inserted into pMzi between the XbaI and XhoI sites. (ii) *GST fusions.* All HPV31 E1 and HPV11 E1 GST fusion plasmids were constructed by inserting PCR-amplified E1 fragments between the BamHI and EcoRI sites of plasmid AB-401, a modified version of pGEX-4T-1 (GE Healthcare) in which a sequence encoding a six-histidine tag has been inserted downstream of the GST coding region. The N-terminal domain of different PV types were defined by amino acid sequence alignment with HPV11 E1(1-191) and are as follows: HPV1

E1(1-159), HPV6 E1(1-191), HPV16 E1(1-190), HPV18 E1(1-197), HPV31 E1(1-170), BPV1 E1(1-149), CRPV E1(1-148). (iii) *Fluorescent protein fusions*. For the HPV11 E1N-GFP construct, the DNA sequence encoding amino acids 1-191 was PCR-amplified and inserted into pGFP²-N1 (PerkinElmer) between the EcoRI and BamHI sites. The GFP-HPV11 E1(1-649) expression vector was obtained by cloning the full length HPV11 E1 open reading frame (ORF) into pQBI25-FC1 (Qbiogene) between the BamHI and HindIII sites. The EYFP-HPV31 E1 plasmid was obtained by inserting the HPV31 E1 ORF between the XhoI and BamHI sites of the pEYFP-C1 vector (Clontech). To obtain the RFP-p80 expression plasmid, monomeric RFP1 (4) was first cloned between the KpnI and NotI sites of pcDNA3, and the p80-amplified ORF inserted between the NotI and XbaI sites. Site-directed mutagenesis was performed using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). All DNA constructs were verified by sequencing. Primer sequences and additional details on the construction of these plasmids will be made available upon request.

Cell culture and transfections. The monkey epithelial cell line COS-7 as well as the human epithelial kidney (HEK) cell line 293 and its derivative EcR-293, which expresses the ecdysone receptor, were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS and 2 mM L-glutamine. For the growth of stably transfected cell lines, the culture medium was supplemented with 30 µg/ml bleocin (for EcR-293 cells) and 300 µg/ml geneticin (for EcR-293 cells expressing TAP-tagged versions of E1) to maintain selection of the transgenes. Human foreskin keratinocytes (HFK) were maintained in KGM (Clonetics) or in E medium in presence of mitomycin C (Boehringer Mannheim)-treated fibroblast feeders. Transfections of COS-7 and EcR-293 cells were performed using the lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen), unless indicated otherwise. HFK were transfected using the Fugene 6 reagent (Roche) according to the manufacturer's protocol.

Tandem affinity protein purification (TAP). TAP was performed essentially as described (19). A brief description of the method is provided below. (i) *Construction of stable cell lines.* EcR-293 cells were transfected with TAP-tagged expression plasmids using the calcium phosphate method. Plasmid-containing cells were isolated by a two week selection with G418. Single cells were isolated in 96-well plates and after expansion, tested for TAP-tagged protein expression upon a 24 h induction with 3 μ M ponasterone A (Invitrogen), an ecdysone analogue. Cells were lysed in ice-cold cell lysis buffer (0.1% Triton X-100, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0). Total cellular proteins were then separated on SDS-PAGE and TAP-tagged protein expression visualized by Western blot analysis using an anti-Rpb1 antibody (note that the specificity of this antibody is irrelevant; rather it is the fact that it is an IgG antibody that makes it bind to the protein A portion of the TAP-tag). (ii) *Preparation of whole cell extracts (WCE).* WCE were made from ~7-8 g of TAP-E1 expressing cells. Cells were resuspended in 4/3 volume (ml/g of cells) of buffer A (10 mM HEPES-NaOH pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM AEBSF, protease inhibitor cocktail (Roche)) and homogenized using a Potter Teflon-Glass homogenizer. One volume of buffer B (50 mM HEPES-NaOH pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM DTT, 0.5 mM AEBSF, 1.26 M potassium acetate, 75% glycerol) was then added and a second homogenization step performed. WCE were cleared by a 3 h ultracentrifugation at 124 500 g using a 50.2 Ti rotor (Beckman Coulter) and dialysed overnight (10 mM HEPES-NaOH pH 7.9, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.1 mM potassium acetate, 10% glycerol). All steps were performed at 4°C. The salt concentration after dialysis was assessed by measuring conductivity. (iii) *Protein purification.* Binding to IgG sepharose beads (GE Healthcare) was performed in buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.1% triton X-100 and 10% glycerol for 1 h and then washed four times with the IgG binding buffer and once with the tobacco etch virus (TEV) protease buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.5 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT). Protein

complexes were then eluted overnight with TEV protease (Invitrogen) (30 U/g of cells) in TEV buffer. Binding to calmodulin sepharose beads (Stratagene) was performed in buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM imidazole, 1 mM Mg acetate, 2 mM CaCl₂, 0.1% triton X-100, 10% glycerol and 10 mM β -mercaptoethanol. Final elution was performed in 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM imidazole, 1 mM Mg acetate, 2 mM EGTA and 10 mM β -mercaptoethanol.

Protein identification by mass spectrometry. Proteins co-purifying with E1 were separated on SDS-PAGE, stained with silver or Sypro ruby (Bio-Rad) and gel slices excised and digested with trypsin as previously described (19). Tryptic peptides were identified by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with microcapillary reversed-phase high-pressure liquid chromatography coupled to a LCQ DecaXP (ThermoFinnigan) or a LTQ (ThermoElectron) quadrupole ion trap mass spectrometer with a nanospray interface. Resulting peptide MS/MS spectra were interpreted using the MASCOT (Matrix Science) software and searched against proteins in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) non-redundant protein database or Uniref protein database (2). Many peptide sequences were confirmed by manual inspection of the spectrum.

Co-immunoprecipitation assays. All steps were performed at 4°C. Transfected cells were lysed 48 h post-transfection in co-immunoprecipitation (co-IP) buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail, 1 mM DTT, 1 mM AEBSF) for 30 min. Protein concentration of cleared WCE was determined using the Bio-Rad Bradford assay, and then 1 mg of WCE was incubated with 1 μ g anti-GFP or anti-Xpress antibodies for 90 min. Non-specific aggregates were pelleted by a 10 min microcentrifugation at 14 000 g. Proteins were precipitated for 3 h with 25-30 μ l protein G-sepharose (GE

Healthcare). The beads were washed 4 times with co-IP buffer and resuspended in 25 μ l of 2.5x Laemmli buffer and the proteins analyzed by SDS-PAGE and/or Western blotting.

Antibodies and Western blotting. The rabbit antiserum against the C-terminal domain of p80 was kindly provided by Dr. Jae U. Jung (Harvard University). The mixture of two mouse monoclonal antibodies against GFP was purchased from Roche, the mouse monoclonal β -tubulin antibody from Sigma-Aldrich, and the mouse monoclonal antibody against the Xpress epitope and the Alexa Fluor 633-conjugated antibody from Invitrogen. For Western blot analysis, proteins were transferred onto PVDF membranes and detected using HRP-conjugated donkey anti-rabbit (GE Healthcare), sheep anti-mouse (GE Healthcare) or goat anti-mouse (Sigma Aldrich) secondary antibodies, and an enhanced chemiluminescence detection kit (GE Healthcare).

Confocal microscopy. COS-7 cells were grown on coverslips. 24 h post-transfection, cells were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 min when required and the background quenched with a 10 min incubation in 50 mM NH_4Cl -PBS. DNA was stained with TO-PRO-3 (Molecular Probes). For immunofluorescence studies, cells were incubated with anti-Xpress antibody diluted 1:500 in PBS-2% milk for 1.5 h, followed by 1 h incubation with a 1:1000 dilution of Alexa Fluor 633-conjugated secondary antibody. Cells were washed with PBS between each step. Cells were mounted using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Images were acquired using a LSM510 confocal laser coupled to an Axiovert 100M inverted scanning microscope (Zeiss, Toronto, CAN). Image analysis was carried out using LSM Image Browser version 3.2.0.70 (Zeiss, Toronto, Canada).

Purification of GST fusion proteins and pulldown assays. GST fusion proteins were produced in *E. Coli* BL21 (DE3) (Novagen) as previously described (47). For protein purification, bacterial cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 M NaCl, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 5 mM DTT, 0.1% NP-40 and anti-protease cocktail) using a French Press at 1200 psi. Bacterial extracts were cleared by centrifugation at 15 000 g in a Sorvall SS-34 rotor (Beckman Coulter) for 30 min. Supernatants were incubated with glutathione-sepharose beads (GE Healthcare) for 3 h in low-salt lysis buffer (0.5 M NaCl). Immobilized proteins were washed with 40 volumes of wash buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 5 mM DTT, 0.1% NP-40, 5 mM DTT) containing 0.5 M NaCl, followed by another 40 volumes of wash buffer containing 0.2 M NaCl. GST fusion proteins were eluted with buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 5 mM DTT and 20 mM reduced glutathione. Following dialysis against elution buffer without reduced glutathione, proteins were quantified using the Bio-Rad Bradford assay. GST pulldown experiments were performed as described in (47).

Transient HPV DNA replication assay. Short-term replication assays were performed essentially as described (64). Two days prior to transfection, C33A cells were seeded at 6×10^5 in a 10 cm dish. Cells were transfected with 3 μ g of pSG5-E1, 1 μ g of pSG5-E2 and 1 μ g of pGL3-E1Luc, which contains the viral origin of replication. Low molecular weight DNA was harvested 72 h post-transfection by HIRT extraction method and subsequently digested with KpnI to linearize the origin-containing vector, as well as with DpnI to digest any unreplicated DNA. Southern blot was performed and replicated DNAs detected by hybridization with a 32 P-labeled HPV31 E1Luc DNA probe followed by autoradiography.

HPV31 genome maintenance and amplification assays. Wild type and mutant HPV31 genomes (accession number J04353, (13)) were released from the pBR322min plasmid (18) by restriction enzyme digest, followed by heat inactivation of enzymes and unimolecular ligation with T4 DNA ligase (New England Biolabs). The genomes were then precipitated in 35% isopropyl alcohol and 10% NaCl overnight at -20°C and resuspended in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.5). Genomes were co-transfected with pSV₂neo vector in HFK cells grown to 30% confluence in 10 cm dishes. After 24 h, the transfected cells were trypsinized and replated onto tissue culture dishes containing E medium with epidermal growth factor and J2 fibroblast feeder cells. After G418 selection was completed, HFK were suspended in 1.5% methylcellulose-containing E medium (methylcellulose solution was prepared as previously described (11)) to induce differentiation. Fibroblast feeders were removed prior to cell harvesting at 0, 24 and 48 h by 2 min treatment with PBS containing 0.5 mM EDTA. Following centrifugation and washing, cells were resuspended in DNA lysis buffer (400 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA, 50 µg/ml RNase A and 0.2% SDS) and incubated overnight at 37°C. Samples were then passed through an 18-gauge needle 10 times to shear the DNA, which was next extracted by phenol-chloroform followed by ethanol precipitation. TE-resuspended DNA was finally analyzed by Southern blot as previously described (53) to detect HPV31 genomic DNA.

RESULTS

Identification of the WD repeat protein p80 (WDR48) as a novel cellular interacting partner of the HPV11 E1 helicase. Tandem affinity purification (TAP) has become the method of choice for efficient purification of cellular protein complexes under native conditions. A TAP procedure adapted to human cells (19) was therefore used to isolate cellular proteins that associate with the HPV11 E1

helicase expressed in HEK293 cells, a cell line capable of supporting transient HPV DNA replication (5, 9, 51). The TAP tag used in these experiments consisted of two IgG binding domains from *Staphylococcus aureus* protein A and a calmodulin-binding peptide, separated by a tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site. This TAP tag was fused at the N- and C-terminus of the complete HPV11 E1 helicase and both fusion proteins were stably expressed in EcR-293 cells under the control of an ecdysone-inducible promoter (Fig. 1A). Since we anticipated that the full length HPV11 E1 (11E1FL) might be difficult to purify under native conditions, functional domains of the protein were also expressed in EcR-293 cells. Specifically, we chose to express for subsequent purification the N-terminal regulatory domain alone (aa 1-191), a fragment spanning both the N-terminal domain and the origin binding domain (OBD) (aa 1-353) and the C-terminal helicase domain (353-649), the latter fused to the SV40 NLS to ensure its proper nuclear localization (Fig. 1A).

The levels of expression of the different E1 constructs before and after a 24 h induction with 3 μ M of the ecdysone analogue ponasterone A are shown in Fig. 1A. Western blot analysis of HPV11 E1(1-353)-TAP consistently revealed three bands that were observed in all stable clones tested. The larger one was of the expected molecular weight for HPV11 E1(1-353)-TAP whereas the two lower bands were smaller and probably corresponded to proteolytic fragments since they were only observed upon induction with ponasterone A. TAP of E1-containing protein complexes was then attempted from all cell lines, under induced and non-induced conditions (see Materials and Methods). Purified protein complexes were separated on SDS-PAGE and visualized by Sypro ruby staining. Unfortunately, we have been unable to purify 11E1FL or its C-terminal domain using the standard TAP procedure. Although the exact reason for this is unclear our results are consistent with our previous observation (58) and that of others (44) that recombinant HPV11 E1 is difficult to purify unless high concentrations of salt are used throughout all chromatographic steps. In order to avoid disrupting the integrity of E1-containing protein complexes, we did not consider the use of high salt concentrations during the

TAP procedure. Fortunately, TAP using the N-terminal domain of HPV11 E1 (11E1N), or this domain together with the OBD, was successful. The compositions of the purified complexes analyzed by SDS-PAGE are shown in Fig. 1B. Major protein bands were cut, digested by trypsin and identified by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). This analysis led to the identification of two E1-associated proteins, namely cyclin-dependant kinase 2 (Cdk2) and the WD repeat protein p80 (WDR48 or p80). Cdk2, in complex with cyclin E or A, is known to interact with the N-terminal domain of HPV11 E1 through a conserved cyclin-binding motif, RxL, located between aa 123-127 (10, 31). The identification of Cdk2 validates the efficacy of our TAP procedure for the purification of E1-associated proteins. As for p80, little is known about its function. Structurally, its main distinguishing feature is the presence of 7 to 8 WD repeats in its N-terminal region (Fig. 1C). Functionally, p80 was first identified as an interaction partner of the *Herpesvirus saimiri* (HVS) tyrosine kinase-interacting protein (Tip), an association that appears to facilitate lysosomal vesicle formation (39). The amino acid sequence of p80 with the tryptic peptides identified by MS (corresponding to 40% of the whole protein sequence) is shown in Fig. 1C.

To confirm the interaction of E1 with p80, we investigated if both proteins could be co-immunoprecipitated in transient transfection experiments. Immunoprecipitations (IP) were performed on whole cell extracts (WCE) made from HEK293 cells expressing 11E1N or 11E1FL fused to GFP, together with Xpress-tagged p80 (Fig. 2). In these experiments, E1 was precipitated using a monoclonal antibody against GFP and the presence of p80 in the precipitate assessed by Western blotting with an anti-p80 polyclonal antibody. As shown in Fig. 2A, p80 was co-immunoprecipitated by 11E1N, confirming that both proteins do interact in vivo. p80 was also co-immunoprecipitated with 11E1FL though at lower levels, presumably due to its lower levels of expression compared to 11E1N. Furthermore, the co-IP of 11E1FL with p80, as well as that of 11E1N with p80, was clearly detectable when p80 was immunoprecipitated with an anti-Xpress monoclonal antibody (Fig. 2B).

Thus, our TAP procedure has allowed the identification of the WD repeat protein p80 as a new cellular binding partner of HPV11 E1, an interaction that was confirmed by co-IP.

Intracellular co-localization of p80 and HPV11 E1. While E1 is primarily a nuclear protein, p80 has been reported to be in the cytoplasm and to partially localize to the late endosomal/lysosomal compartments (39). This led us to investigate the cellular co-localization of these proteins by confocal microscopy using GFP fusions of 11E1N and 11E1FL, and Xpress-tagged p80. Expression and migration of these fusion proteins at their predicted molecular weight was first verified by Western blot analysis using anti-GFP or anti-Xpress antibodies (Fig. 3A). Localization studies were done using three different cell lines (HEK293, C33A and COS-7) with comparable results. Fig. 3B shows the pictures obtained for COS-7 cells. As anticipated, both the N-terminal domain, which retains the bipartite NLS, and 11E1FL were predominantly nuclear. Also, as previously reported (39), p80 was observed almost exclusively in the cytoplasm although it did not present the reported punctate distribution of a protein localizing to endosomal compartments (Fig. 3B). We also obtained the same diffuse cytoplasmic pattern using p80 fused to RFP, rather than Xpress, in HeLa, HEK293 and COS-7 cells. Furthermore, we did not observe co-localization of p80 with LAMP-1, a marker of the late endosomes (data not shown). Thus under our experimental conditions, p80 is located throughout the cytoplasm.

11E1N was found to co-localize with p80 in the three cell lines tested. Strikingly, whereas p80 is cytoplasmic in absence of E1, it was re-localized to the nucleus when co-expressed with 11E1N (Fig. 3C). In fact, in cells where 11E1N was expressed, p80 could be exclusively found in the nucleus. This does not necessarily imply that all of p80 is translocated to the nucleus during HPV infection as this may depend on the amount of E1 produced. It does suggest, however, that the interaction of 11E1N with p80 is neither weak nor transient. The redistribution of p80 by 11E1N

was also observed in two epithelial cell lines, HeLa (HPV18-positive) and C33A (HPV-negative) (data not shown). Importantly, re-localization of p80 was observed also for 11E1FL (Fig. 3C) although some p80 remained in the cytoplasm. The fact that 11E1FL is expressed at much lower levels than 11E1N (Fig. 2A and data not shown) is likely the reason why some p80 was not re-localized to the nuclear compartment. We surmised that the E1-p80 complex forms in the cytoplasm and is then imported into the nucleus via the E1 nuclear localization signal (NLS). To validate this hypothesis, we showed that an 11E1N protein with a mutant NLS (K83G/R84G) was unable to relocalize p80 to the nucleus (Fig. 3C). Collectively, these studies provided further evidence that E1 and p80 form a complex *in vivo*, which is imported into the nucleus via the E1 NLS.

p80 binds to a short 30 amino acids sequence in the N-terminal domain of HPV11 E1. To further confirm the interaction of E1 with p80 and develop a rapid method to map the region of E1 implicated in p80 binding, we tested if both proteins could interact in glutathione-S-transferase (GST) pulldown assays. These experiments were initially performed using three different fragments of HPV11 E1 fused to GST (Fig. 4A). Affinity columns were prepared by immobilizing GST and GST-E1 fusion proteins on glutathione-sepharose (GSH) beads at a concentration of 4 mg/ml and then loaded with EcR-293 WCE, washed, and the bound proteins eluted with buffer containing reduced glutathione. These eluates were then analyzed by Western blotting for the presence of p80, and Cdk2 as a control (Fig. 4A). These experiments confirmed that 11E1N (aa 1-191) interacts specifically with p80 in contrast to the OBD (aa 191-353), which was used as a negative control. Interestingly, a fusion protein containing the N-terminal domain and the OBD, but lacking the first 72 aa, did not interact with p80 although it retained the ability to bind Cdk2. This finding suggested that the p80 binding site on E1 is contained, at least in part, within these first 72 aa.

To delineate further the minimal region of E1 required for p80 binding, a series of C-terminal truncations starting at aa 80 were constructed and tested in pulldown assays for their ability to bind p80 out of an extract (Fig. 4B). These studies indicated that aa 1-40 of 11E1 are sufficient for binding p80. Weak binding to p80 was also observed for 11E1(1-35). Note that in all of these experiments and subsequent ones the eluted proteins were analyzed on SDS-PAGE and stained with coomassie blue to ascertain that a lack of interaction was not due to a failure of the GST fusion proteins to be properly eluted (data not shown). Similarly, a series of N-terminal truncations in 11E1(1-40) were created (Fig. 4B). Binding to p80 was retained when the first 10 residues were deleted but lost upon removal of the first 15 (Fig. 4B). Thus, the minimal p80 interacting region on HPV11 E1 spans aa 10 to 40. This region is predicted to fold as a short β -sheet (spanning aa 17 to 25) by the PROF secondary structure prediction program (45, 46).

The interaction between E1 and p80 is conserved among genital HPV types. The GST pulldown assay described above was used to test if the interaction of E1 with p80 was conserved among different types of PV (Fig. 4C). Specifically, we tested whether p80 could bind to the E1 N-terminal domains from one cutaneous type (HPV1), two genital low-risk types (HPV6 and HPV11), three high-risk types (HPV16, 18 and 31), and the two prototypical animal types bovine PV type 1 (BPV1) and cottontail rabbit PV (CRPV). As shown in Fig. 4C, p80 binding was neither detected with the cutaneous type E1 (HPV1) nor with BPV1 or CRPV E1. In contrast, the E1 proteins from all genital HPV tested, including those from low- and high-risk types, bound to p80 (Fig. 4C). Thus, the interaction between E1 and p80 appears to be a conserved and specific feature of HPV infecting genital mucosal epithelia.

Identification of amino acid substitutions in HPV11 E1 that abrogate its interaction with p80. For the purpose of testing the biological significance of the E1-p80 interaction, we set out to identify mutant E1 proteins specifically defective in

p80-binding. Residues of the E1 p80-binding domain that are highly conserved among genital HPV types were changed to alanine and the resulting mutant proteins tested for their ability to bind p80. Five double aa substitutions (Fig. 5A) were introduced into GST-11E1(1-40) and tested for p80 binding in pulldown assays. As shown in Fig. 5B, three of the five double aa substitutions (WF, VE, VI) severely impaired p80 binding. Additionally, co-IP experiments were performed to confirm that these three substitutions do indeed affect p80 binding (Fig. 5C). Plasmids expressing GFP-11E1FL, either the wild type (WT) or one of the three mutant proteins, were co-transfected with the Xpress-p80 expression vector in HEK293 cells. IP of p80 was carried out 48 h post-transfection using an anti-Xpress antibody and the precipitates analyzed for the presence of E1, as well as p80 protein as a control, by Western blotting. As shown in Fig. 5C, none of the three 11E1FL mutant proteins co-precipitated with p80 as compared to WT E1, indicating that they are also unable to associate with p80 in vivo. Finally, we investigated the effect of these three substitutions on the ability of 11E1N-GFP to re-localize RFP-p80 from the cytoplasm to the nucleus (Fig. 6). p80 was found to remain cytoplasmic in cells expressing the three mutant E1 proteins in contrast to cells expressing WT 11E1N where it was re-localized to the nucleus. From a mechanistic point of view, this result provided strong evidence that re-localization of p80 by 11E1N depends on an interaction between both proteins.

Construction of mutant HPV31 E1 proteins defective for p80-binding.

Because functional assays involving immortalization of primary keratinocytes with cloned HPV genomes can only be performed with high-risk HPV types, we engineered the same three aa substitutions as above in HPV31 E1. First, we introduced them in the N-terminal domain of HPV31 (aa 1-170), and confirmed by GST pulldown assays that they also affect binding to p80 in this context (Fig. 7A). As a control we showed that the mutant proteins retained the ability to bind Cdk2 (Fig. 7A), thereby indicating that their overall structure is not grossly altered. Next, we

performed a series of confocal microscopy studies to test the effect of these substitutions on the intracellular localization of full length HPV31 E1 (31E1FL) fused to EYFP in COS-7 cells. As anticipated, the mutant E1 proteins still accumulated in the nucleus, like their WT counterpart (data not shown and Fig. 7B). Satisfyingly, we found that WT EYFP-31E1FL could re-localize p80 to the nucleus, whereas the mutant proteins did not (Fig. 7B). Together these results indicate that these three aa substitutions do affect the ability of HPV31 E1 to interact with p80 in vitro as well as in vivo.

Transient replication activity of HPV31 E1 proteins defective for p80-binding. To investigate if the E1-p80 interaction is needed for viral DNA replication, we tested whether the p80-binding defective HPV31 E1 mutant proteins described above were capable of supporting transient HPV DNA replication in C33A cells. As shown in Fig. 8A, all three mutant proteins could support transient replication albeit at a reduced level compared to the wild type protein. To investigate if this replication defect was due to a reduced accumulation of the mutant proteins, we determined their steady-state levels in C33A cells, relative to that of the wild type. However, since there are no anti-E1 antibodies suitable for such studies, we investigated accumulation of wild type and mutant E1 fused to EYFP, which can be visualized by western blotting with an anti-GFP antibody. These studies showed that all three mutant proteins were expressed at levels comparable to that of the wild type at 24, 48 and 72 h post transfection, indicating that their replication defect is not due to reduced accumulation. In fact, we consistently noted that the WF mutant, and to a lesser extent the VI mutant, accumulated at slightly higher levels than wild type E1. Collectively, these results suggest that the interaction of E1 with p80 is required for efficient viral DNA replication although some basal levels can still occur in its absence.

Ability of the mutant HPV31 E1 proteins to support maintenance and amplification of the viral episome in primary human keratinocytes. To further investigate the significance of the E1-p80 interaction in the HPV life cycle, we examined whether the three aa substitutions in E1 that abrogate p80 binding had any effect on the maintenance of the HPV31 episome in human foreskin keratinocytes (HFK). To do this, we transfected circular WT and mutant HPV31 genomes into primary HFK along with a G418-resistance marker, and subsequently selected and expanded drug-resistant immortalized cell clones. Southern blotting was then used to determine the status of the viral genome in these cell clones prior to or following 24 or 48 h of growth in methylcellulose to induce cellular differentiation and amplification of the viral episome. As shown in Fig. 9, two of the mutant genomes, mWF and mVE, were not present in episomal form whereas the third one, mVI, was present at a much reduced copy number compared to the wild type. For the mVI mutant, some levels of amplification were detected upon differentiation in methylcellulose. Similar results were obtained with HFKs from a different donor (data not shown). Collectively, these results suggest that the E1-p80 interaction is important for maintaining wild type levels of episomes in undifferentiated cells but may not be essential for the differentiation-dependent amplification of the genome.

DISCUSSION

In this study, we used a TAP approach coupled to mass spectrometry (MS) to identify cellular interacting partners of the E1 helicase from HPV11. This led us to the discovery of a novel interaction between the N-terminal 40 aa of HPV11 E1 and the WD repeat protein p80, an interaction that is specific to low- and high-risk genital HPV types. Our study of E1 mutants defective in p80 binding suggests that this interaction is important for maintenance of the viral episome in undifferentiated keratinocytes.

Identification of p80 as a new cellular target of the E1 helicase from genital HPV. Purification of E1-associated cellular proteins yielded p80 as a new interaction partner of E1, a finding confirmed by co-IP and co-localization studies as well as by protein affinity chromatography (GST pulldowns). TAP-purification of E1 also identified Cdk2, which was already known to interact with E1 in association with cyclins A or E through a conserved CBM, thus validating our approach. p80 is a protein whose cellular function remains largely unknown. It is expressed in most tissues, including skin. Furthermore, we have shown that the endogenous p80 protein can be purified by GST-E1 affinity chromatography not only from HEK293 cells but also from the HeLa and C33A cell lines (data not shown). The main structural features of p80 are the presence of 7-8 WD repeats in the N-terminal half of the protein and of a putative coiled-coil domain in the C-terminal part. WD-repeat domains are found in 1-2% of eukaryotic proteins of many diverse functions. Most structurally characterized WD repeat proteins contain seven such repeats, although not all are readily identifiable by sequence alignment. These repeats fold into a seven-bladed β -propeller that serves as a stable platform for protein interactions (reviewed in (26, 48)). Accordingly, our preliminary mapping data suggests that the WD repeats of p80 are mediating its interaction with E1 (unpublished).

Characterization of the E1-p80 interaction. We determined that the minimal p80 binding domain on E1 spans aa 10 to 40. This region contains many non-polar residues consistent with it being a hydrophobic protein interaction interface. By mutagenesis of residues conserved between genital HPV types, we identified three aa doublets critical for p80 interaction that lie in a region predicted to fold as a β -sheet (45, 46). Collectively, these observations suggest that E1 binds to p80 through a hydrophobic β -sheet. Our data also point toward this interaction being relatively strong and stable. To begin with, p80 was co-purified with E1 by TAP in

nearly stoichiometric amounts (Fig. 1). Furthermore, substantial quantities of p80 could also be purified from WCE by GST-E1 affinity chromatography (Fig. 4 and 7 and data not shown). p80 is in fact the predominant protein in E1-affinity column eluates analyzed by SDS-PAGE and silver staining (data not shown). Lastly, the fact that p80 can be efficiently translocated from the cytoplasm to the nucleus (Fig. 6 and 7) also argues for a stable interaction. Re-localization of p80 by the 11E1N was highly efficient such that almost all of p80 was nuclear in cells expressing this E1 fragment. If the interaction was transient, we would expect a fraction of p80 to remain cytoplasmic. We have begun to address the mechanism by which p80 is redistributed to the nuclear compartment. Thus far we have gathered evidence that the interaction of E1 with p80 is needed for this redistribution, as mutant E1 protein defective in p80 binding do not re-localize it to the nucleus. We have also shown that the integrity of the E1 NLS is important for p80 relocalization. Thus, our current model is that the E1-p80 complex forms in the cytoplasm and is imported to the nucleus via the E1 NLS. As HPV E1 has been shown to shuttle between the nucleus and cytoplasm (10), there might be many opportunities for E1 to interact with p80 and efficiently bring it into the nucleus.

Known functions of p80. p80 was first isolated as a cellular protein that associates with the tyrosine kinase-interacting protein (Tip) from the lymphotropic *Herpesvirus saimiri* (HVS) (39). Tip, as its name suggests, also associates with a kinase, Lck, involved in T-cell receptor (TCR) signaling (39). Interestingly, interaction of Tip with Lck and p80, through separate domains, results in lower cell-surface expression of the TCR and of CD4, respectively, perhaps as a mean of immune evasion. The interaction of Tip with p80 was found to induce the formation of large cytoplasmic vesicles into which the TCR is recruited for down-regulation (38, 39). The group which performed these studies also reported that p80 is localized to the late endosome and lysosome. Specifically, they showed by immunofluorescence that Xpress-tagged p80 displays a punctate staining in COS-1,

HEK293T and Jurkat-T cells, and co-localizes significantly with LAMP1 in Jurkat-T cells. However, in our hands, the same Xpress-tagged p80, or p80 fused to RFP, was distributed throughout the cytoplasm in all the cell lines tested (HeLa, C33A, HEK293 and COS-7 cells) and did not co-localize with LAMP1 (data not shown). Although we do not know the reason for this discrepancy, it may be related to different levels of p80 expression, which we kept as low as possible in our experiments.

Possible functions of the E1-p80 interaction in the HPV life cycle. To address the function of the E1-p80 interaction, we took the approach of identifying aa substitutions in E1 that specifically abrogate p80 binding and examined their effect on the maintenance and differentiation-dependent amplification of the HPV31 episome in immortalized HFK. Three double aa substitutions were isolated, within a 10 aa stretch of E1, which abrogated its interaction with p80 but had no effect on its binding to Cdk2 or nuclear localization. Thus, all three substitutions appeared to specifically impair p80 binding. Mutant E1 proteins bearing these substitutions were capable of supporting transient HPV DNA replication, albeit at a reduced level. This data is consistent with a previous study showing that truncation of the first 80 aa of HPV11 E1, and thus encompassing the p80 binding domain, reduces transient replication in vivo (51). The fact that these mutant proteins retained some, albeit lower, replication activity suggest that the E1-p80 interaction is not essential for DNA replication per se and is consistent with our previous report that the N-terminal 166 aa of HPV11 E1 are not required for HPV DNA replication in vitro (1). On the other hand, the observation that these mutant proteins were not as active as wild type E1 suggests a role of the E1-p80 interaction in maintaining high levels of replication. Efficient viral DNA replication might be of crucial importance for the long term maintenance of the episome in infected cells. In support of this notion, we found that mutant HPV31 genomes bearing the p80-binding substitutions were either not maintained or maintained only at a much lower copy number in immortalized HFK.

Our current working model is that the reduction in replication efficiency brought about by substitutions in E1 affecting p80-binding leads to a gradual loss of the viral episome over several cell divisions. However, we cannot rule out at this point that the E1-p80 interaction plays additional roles in episomal maintenance, such as a role in segregation of the episome, for example. Importantly, our results suggest that interfering with the E1-p80 interaction would result in the loss of the viral episome from infected cells and hence might be a valuable antiviral strategy for the treatment of HPV infections.

Interestingly, we have shown recently that the N-terminal domain of E1 contains a conserved DxxD caspase-3 cleavage site located immediately C-terminal of the p80-binding region and that caspase-3 is activated in HPV31-containing keratinocytes upon differentiation (36). Furthermore, either mutation of the cleavage site or inhibition of caspases using a small-molecule inhibitor impairs viral genome amplification (36). These findings suggest a model where caspase-3, activated upon keratinocyte differentiation, would cleave E1 and remove its p80-binding site; a model consistent with the finding that the mVI mutant E1 proteins defective for p80-binding retains the ability to support differentiation-dependent amplification. An intriguing possibility that is currently being tested in our laboratories is that caspase 3-mediated removal of the p80-binding site increases the activity and/or accumulation of E1 in order to promote amplification of the viral genome.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank S. Bourassa and I. Kelly from the Eastern Quebec Proteomics Center for the identification of proteins by mass spectrometry as well as Dr. Jae U. Jung (Harvard University) for the gift of p80 antibodies and expression vectors. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research to J.A. and B.C, and from the National Cancer Institute to L.A.L. A.C.-M. was

supported by a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). C. M. was supported by a postdoctoral fellowship from the American Cancer Society. G.G.P holds a Canada Research Chair in Proteomics. J.A. is a senior scholar from the FRSQ.

REFERENCES

1. **Amin, A. A., S. Titolo, A. Pelletier, D. Fink, M. G. Cordingley, and J. Archambault.** 2000. Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology* **272**:137-50.
2. **Bairoch, A., R. Apweiler, C. H. Wu, W. C. Barker, B. Boeckmann, S. Ferro, E. Gasteiger, H. Huang, R. Lopez, M. Magrane, M. J. Martin, D. A. Natale, C. O'Donovan, N. Redaschi, and L. S. Yeh.** 2005. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* **33**:D154-9.
3. **Bossis, G., and F. Melchior.** 2006. SUMO: regulating the regulator. *Cell Div* **1**:13.
4. **Campbell, R. E., O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien.** 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7877-82.
5. **Chiang, C. M., M. Ustav, A. Stenlund, T. F. Ho, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 1992. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:5799-803.
6. **Clower, R. V., J. C. Fisk, and T. Melendy.** 2006. Papillomavirus E1 protein binds to and stimulates human topoisomerase I. *J Virol* **80**:1584-7.
7. **Conger, K. L., J. S. Liu, S. R. Kuo, L. T. Chow, and T. S. Wang.** 1999. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* **274**:2696-705.
8. **Cueille, N., R. Nougarede, F. Mechali, M. Philippe, and C. Bonne-Andrea.** 1998. Functional interaction between the bovine papillomavirus virus type 1 replicative helicase E1 and cyclin E-Cdk2. *J Virol* **72**:7255-62.
9. **Deng, W., G. Jin, B. Y. Lin, B. A. Van Tine, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 2003. mRNA splicing regulates human papillomavirus type 11 E1 protein production and DNA replication. *J Virol* **77**:10213-26.
10. **Deng, W., B. Y. Lin, G. Jin, C. G. Wheeler, T. Ma, J. W. Harper, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 2004. Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J Virol* **78**:13954-65.

11. **Fehrmann, F., D. J. Klumpp, and L. A. Laimins.** 2003. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol* **77**:2819-31.
12. **Ferran, M. C., and A. A. McBride.** 1998. Transient viral DNA replication and repression of viral transcription are supported by the C-terminal domain of the bovine papillomavirus type 1 E1 protein. *J Virol* **72**:796-801.
13. **Goldsborough, M. D., D. DiSilvestre, G. F. Temple, and A. T. Lorincz.** 1989. Nucleotide sequence of human papillomavirus type 31: a cervical neoplasia-associated virus. *Virology* **171**:306-11.
14. **Han, Y., Y. M. Loo, K. T. Militello, and T. Melendy.** 1999. Interactions of the papovavirus DNA replication initiator proteins, bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen, with human replication protein A. *J Virol* **73**:4899-907.
15. **Hebner, C. M., and L. A. Laimins.** 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev. Med. Virol.* **16**:83-97.
16. **Hsu, C. Y., F. Mechali, and C. Bonne-Andrea.** 2007. Nucleocytoplasmic shuttling of bovine papillomavirus E1 helicase downregulates viral DNA replication in S phase. *J Virol* **81**:384-94.
17. **Hu, Y., R. V. Clower, and T. Melendy.** 2006. Cellular topoisomerase I modulates origin binding by bovine papillomavirus type 1 E1. *J Virol* **80**:4363-71.
18. **Hubert, W. G., T. Kanaya, and L. A. Laimins.** 1999. DNA replication of human papillomavirus type 31 is modulated by elements of the upstream regulatory region that lie 5' of the minimal origin. *J Virol* **73**:1835-45.
19. **Jeronimo, C., M. F. Langelier, M. Zeghouf, M. Cojocar, D. Bergeron, D. Baali, D. Forget, S. Mnaimneh, A. P. Davierwala, J. Pootoolal, M. Chandy, V. Canadien, B. K. Beattie, D. P. Richards, J. L. Workman, T. R. Hughes, J. Greenblatt, and B. Coulombe.** 2004. RPAP1, a novel human RNA polymerase II-associated protein affinity purified with recombinant wild-type and mutated polymerase subunits. *Mol Cell Biol* **24**:7043-58.
20. **Klumpp, D. J., and L. A. Laimins.** 1999. Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology* **257**:239-46.
21. **Koonin, E. V.** 1993. A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Nucleic Acids Res* **21**:2541-7.
22. **Kuo, S. R., J. S. Liu, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 1994. Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *J Biol Chem* **269**:24058-65.
23. **Lee, D., H. Sohn, G. V. Kalpana, and J. Choe.** 1999. Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature* **399**:487-91.

24. **Lentz, M. R., D. Pak, I. Mohr, and M. R. Botchan.** 1993. The E1 replication protein of bovine papillomavirus type 1 contains an extended nuclear localization signal that includes a p34cdc2 phosphorylation site. *J Virol* **67**:1414-23.
25. **Lentz, M. R., S. M. Stevens, Jr., J. Raynes, and N. Elkhoury.** 2006. A phosphorylation map of the bovine papillomavirus E1 helicase. *Virol J* **3**:13.
26. **Li, D., and R. Roberts.** 2001. WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci* **58**:2085-97.
27. **Lin, B. Y., T. Ma, J. S. Liu, S. R. Kuo, G. Jin, T. R. Broker, J. W. Harper, and L. T. Chow.** 2000. HeLa cells are phenotypically limiting in cyclin E/CDK2 for efficient human papillomavirus DNA replication. *J Biol Chem* **275**:6167-74.
28. **Lin, B. Y., A. M. Makhov, J. D. Griffith, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 2002. Chaperone proteins abrogate inhibition of the human papillomavirus (HPV) E1 replicative helicase by the HPV E2 protein. *Mol Cell Biol* **22**:6592-604.
29. **Liu, J. S., S. R. Kuo, A. M. Makhov, D. M. Cyr, J. D. Griffith, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 1998. Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. *J Biol Chem* **273**:30704-12.
30. **Loo, Y. M., and T. Melendy.** 2004. Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol* **78**:1605-15.
31. **Ma, T., N. Zou, B. Y. Lin, L. T. Chow, and J. W. Harper.** 1999. Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:382-7.
32. **Malcles, M. H., N. Cueille, F. Mechali, O. Coux, and C. Bonne-Andrea.** 2002. Regulation of bovine papillomavirus replicative helicase e1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Virol* **76**:11350-8.
33. **Masterson, P. J., M. A. Stanley, A. P. Lewis, and M. A. Romanos.** 1998. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol* **72**:7407-19.
34. **McShan, G. D., and V. G. Wilson.** 1997. Casein kinase II phosphorylates bovine papillomavirus type 1 E1 in vitro at a conserved motif. *J Gen Virol* **78** (Pt 1):171-7.
35. **Mechali, F., C. Y. Hsu, A. Castro, T. Lorca, and C. Bonne-Andrea.** 2004. Bovine papillomavirus replicative helicase E1 is a target of the ubiquitin ligase APC. *J Virol* **78**:2615-9.
36. **Moody, C. A., A. Fradet-Turcotte, J. Archambault and L. A. Laimins.** 2007. Human Papillomaviruses Activate Caspases Upon Differentiation to Promote Viral Genome Amplification. Summited

37. **Ozbun, M. A., and C. Meyers.** 1998. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J Virol* **72**:2715-22.
38. **Park, J., N. H. Cho, J. K. Choi, P. Feng, J. Choe, and J. U. Jung.** 2003. Distinct roles of cellular Lck and p80 proteins in herpesvirus saimiri Tip function on lipid rafts. *J Virol* **77**:9041-51.
39. **Park, J., B. S. Lee, J. K. Choi, R. E. Means, J. Choe, and J. U. Jung.** 2002. Herpesviral protein targets a cellular WD repeat endosomal protein to downregulate T lymphocyte receptor expression. *Immunity* **17**:221-33.
40. **Peters, J. M.** 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* **9**:931-43.
41. **Rangasamy, D., and V. G. Wilson.** 2000. Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell Ubc9 protein. *J Biol Chem* **275**:30487-95.
42. **Rangasamy, D., K. Woytek, S. A. Khan, and V. G. Wilson.** 2000. SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation. *J Biol Chem* **275**:37999-8004.
43. **Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, and B. Seraphin.** 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**:1030-2.
44. **Rocque, W. J., D. J. Porter, J. A. Barnes, E. P. Dixon, D. C. Lobe, J. L. Su, D. H. Willard, R. Gaillard, J. P. Condreay, W. C. Clay, C. R. Hoffman, L. K. Overton, G. Pahel, T. A. Kost, and W. C. Phelps.** 2000. Replication-associated activities of purified human papillomavirus type 11 E1 helicase. *Protein Expr Purif* **18**:148-59.
45. **Rost, B., P. Fariselli, and R. Casadio.** 1996. Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci* **5**:1704-18.
46. **Rost, B., and C. Sander.** 1993. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol* **232**:584-99.
47. **Senechal, H., G. G. Poirier, B. Coulombe, L. A. Laimins, and J. Archambault.** 2007. Amino acid substitutions that specifically impair the transcriptional activity of papillomavirus E2 affect binding to the long isoform of Brd4. *Virology* **358**:10-7.
48. **Smith, T. F., C. Gaitatzes, K. Saxena, and E. J. Neer.** 1999. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* **24**:181-5.
49. **Stenlund, A.** 2003. E1 initiator DNA binding specificity is unmasked by selective inhibition of non-specific DNA binding. *Embo J* **22**:954-63.
50. **Stenlund, A.** 2003. Initiation of DNA replication: lessons from viral initiator proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:777-85.
51. **Sun, Y., H. Han, and D. J. McCance.** 1998. Active domains of human papillomavirus type 11 E1 protein for origin replication. *J Gen Virol* **79** (Pt 7):1651-8.
52. **Swindle, C. S., and J. A. Engler.** 1998. Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1. *J Virol* **72**:1994-2001.

53. **Thomas, J. T., W. G. Hubert, M. N. Ruesch, and L. A. Laimins.** 1999. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:8449-54.
54. **Titolo, S., K. Brault, J. Majewski, P. W. White, and J. Archambault.** 2003. Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus e1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein. *J Virol* **77**:5178-91.
55. **Titolo, S., A. Pelletier, A. M. Pulichino, K. Brault, E. Wardrop, P. W. White, M. G. Cordingley, and J. Archambault.** 2000. Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin. *J Virol* **74**:7349-61.
56. **Titolo, S., A. Pelletier, F. Sauve, K. Brault, E. Wardrop, P. W. White, A. Amin, M. G. Cordingley, and J. Archambault.** 1999. Role of the ATP-binding domain of the human papillomavirus type 11 E1 helicase in E2-dependent binding to the origin. *J Virol* **73**:5282-93.
57. **Ustav, M., and A. Stenlund.** 1991. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *Embo J* **10**:449-57.
58. **White, P. W., A. Pelletier, K. Brault, S. Titolo, E. Welchner, L. Thauvette, M. Fazekas, M. G. Cordingley, and J. Archambault.** 2001. Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain. *J Biol Chem* **276**:22426-38.
59. **Yamano, H., J. Gannon, H. Mahbubani, and T. Hunt.** 2004. Cell cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin B by the APC/C in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* **13**:137-47.
60. **Yang, L., R. Li, I. J. Mohr, R. Clark, and M. R. Botchan.** 1991. Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. *Nature* **353**:628-32.
61. **Yasugi, T., and P. M. Howley.** 1996. Identification of the structural and functional human homolog of the yeast ubiquitin conjugating enzyme UBC9. *Nucleic Acids Res* **24**:2005-10.
62. **Yasugi, T., M. Vidal, H. Sakai, P. M. Howley, and J. D. Benson.** 1997. Two classes of human papillomavirus type 16 E1 mutants suggest pleiotropic conformational constraints affecting E1 multimerization, E2 interaction, and interaction with cellular proteins. *J Virol* **71**:5942-51.
63. **Zanardi, T. A., C. M. Stanley, B. M. Saviile, S. M. Spacek, and M. R. Lentz.** 1997. Modulation of bovine papillomavirus DNA replication by phosphorylation of the viral E1 protein. *Virology* **228**:1-10.

64. Ziegler, K., T. Bui, R. J. Frisque, A. Grandinetti, and V. R. Nerurkar. 2004. A rapid in vitro polyomavirus DNA replication assay. *J Virol Methods* **122**:123-7.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Identification of cellular proteins that interact with HPV11 E1.

A) EcR-293 stable cell lines expressing different TAP-tagged constructs of HPV11 E1 under the control of an ecdysone inducible promoter. Protein expression was analyzed by Western blotting after a 24 h induction with (+) or without (-) 3 μ M ponasterone A (Pon. A), an ecdysone analogue. The structures of the different TAP-tagged E1 are diagrammed on the left. The amino acid boundaries of the N-terminal (N), origin-binding (OBD) and helicase domains are indicated. The location of the cyclin-binding motif (CBM) is indicated by a dark grey bar. The hatched bar in HPV11 E1(353-649) represents the SV40 nuclear localization sequence that was attached to this construct. B) TAP-purified protein complexes from cells expressing HPV11 E1(1-191) and E1(1-353). Purified proteins were separated on SDS-PAGE and stained with Sypro ruby. Major protein bands indicated by arrows were excised, trypsin-digested and identified by LC-MS/MS analysis. (WDR48; WD repeat protein p80, CDK2; cyclin-dependent kinase 2). Some leaky expression of both TAP-tagged constructs led to the purification of E1 and its associated proteins even in uninduced EcR-293 cells, but in much lower amounts. C) Amino acid sequence of p80. The putative WD domains are shown in italics and the tryptic peptides identified by mass spectrometry underlined.

Figure 2. p80 interacts with HPV11 E1 in co-immunoprecipitation assays. Co-immunoprecipitation of Xpress-fused p80 with GFP-fused HPV11 E1(1-191) (11E1N) and full-length HPV11 E1(1-649) (11E1FL). HEK293 cells were transfected with the indicated combination of expression vectors, harvested 48 h post-

transfection and whole cell extracts submitted to immunoprecipitation using either anti-GFP (A) or anti-Xpress (B) antibodies. (IgG = Antibody heavy chains, IP = immunoprecipitation, IB = immunoblot)

Figure 3. Intracellular localization of p80 and HPV11 E1 in COS-7 cells.

A) Expression levels of GFP-E1 and p80 fusion proteins. COS-7 cells were transiently transfected either with 11E1N-GFP, GFP-11E1FL, or Xpress-p80 expression vectors. Cells were harvested 24 h post-transfection and whole cell extracts submitted to Western blot analysis. B) Cytoplasmic localization of p80 and nuclear localization of 11E1N-GFP and GFP-11E1FL in COS-7 cells. DNA was stained with TO-PRO-3. C) Cellular co-localization of Xpress-p80 with 11E1N-GFP, GFP-11E1FL or 11E1NmNLS-GFP in COS-7 cells.

Figure 4. Mapping of a p80 binding domain on E1 and interaction of p80 with E1 from different papillomaviruses. A) p80 interacts with the N-terminal domain of HPV11 E1. The indicated HPV11 E1 fragments were expressed as GST fusions in bacteria and used in pulldown assays using EcR-293 whole cell extracts. Bound proteins were separated on SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using antibodies directed against p80, or against Cdk2 as a positive control. B) Mapping of p80 interaction domain on HPV11 E1. Short N-terminal peptides of HPV11 E1 were expressed as GST fusions in bacteria and tested for p80 binding in pulldown assays as indicated above. The location of the p80 interaction domain on E1 is illustrated. C) Interaction of p80 with E1 from different papillomavirus types. E1 N-terminal domains of one cutaneous HPV type (1), two genital low risk HPV (6 and 11), three genital high risk HPV (16, 18 and 31), BPV1 and CRPV were expressed as GST fusions and tested for p80 binding in pulldown assays as above.

Figure 5. Amino acid substitutions in HPV11 E1 that abrogate its interaction with p80. A) Amino acid sequence alignment of the p80 interaction domain of E1 from different anogenital HPV types. Boxed amino acids were mutated to alanine. B) Double alanine substitutions were introduced into GST-11E1(1-40) and the resulting mutant proteins used in pulldown assays with EcR-293 whole cell extracts. Bound proteins were separated on SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using a polyclonal anti-p80 antibody. C) Alanine mutants in GFP-11E1FL abrogate its interaction with p80 in co-immunoprecipitation assays. Plasmids containing GFP-fused wild type (WT) or mutants (m) 11E1FL were co-transfected with Xpress-p80 expression vector in HEK293 cells. Whole cell extracts were prepared 48 h post-transfection and submitted to immunoprecipitation using an anti-Xpress antibody. Precipitated proteins were analyzed by Western blot analysis using anti-GFP antibody, or anti-p80 antibody as IP control.

Figure 6. Mutant E1 proteins fail to re-localize p80 from the cytoplasm to the nucleus. A) Expression of RFP-p80 fusion protein. COS-7 cells were transiently transfected with the indicated expression vectors, harvested 24 h post-transfection and whole cell extracts submitted to Western blot analysis with an anti-p80 antibody. B) COS-7 cells were co-transfected with RFP-p80 and wild type (WT) or mutants (m) 11E1N-GFP expression vectors for cellular localization studies.

Figure 7. HPV31 E1 proteins defective for p80 interaction. A) The three E1 double amino acid substitutions previously shown in HPV11 E1 to abrogate interaction with p80 were introduced into a fusion of the HPV31 E1 N-terminal domain to GST. The resulting mutant proteins were purified from bacteria and used in pulldown experiments with EcR-293 whole cell extracts. Bound proteins were analyzed by Western blot analysis using a polyclonal anti-p80 antibody. Western blot analysis using antibody against Cdk2 is shown as control. B) Effect of E1 substitutions on p80 cellular localization. The substitutions were introduced into

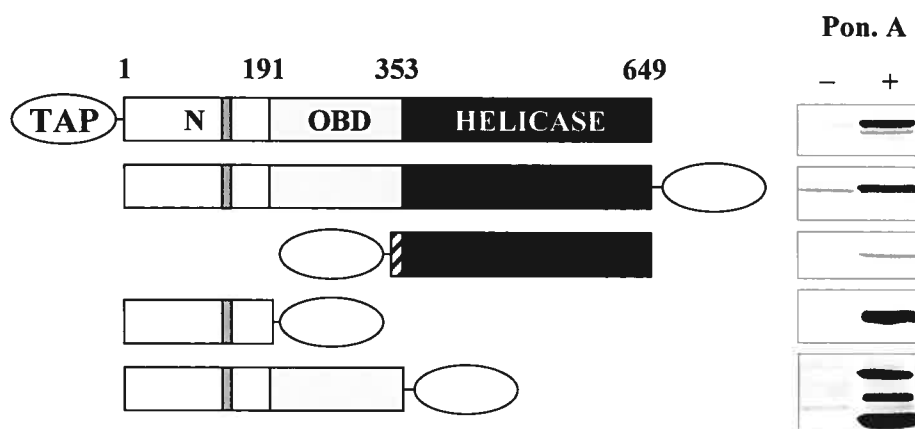
pEYFP-HPV31 E1 expression vector. Wild type (WT) or mutant (m) EYFP-31E1 plasmids were co-transfected along with Xpress-p80 in COS-7 cells and the cellular localization of the encoded proteins analyzed by confocal microscopy.

Figure 8. Transient replication activity of mutant HPV31 E1 proteins. A) Transient HPV DNA replication. C33A cells were transfected with 3 μ g of wild type (lane 1) or the indicated mutant E1 expression vector (lanes 2-4) plus 1 μ g of E2 expression vector and 1 μ g of HPV31Luc vector which contains the origin of replication. As negative controls, cells were transfected with the origin-containing vector alone (No E1 and E2; lane 5) or with the E2 and HPV31Luc vectors (No E1; lane 6). B) Accumulation of wild type and mutant EYFP-HPV31 E1. The levels of the indicated E1 proteins in transfected C33A cells were detected by western blotting with an anti-GFP antibody, 24, 48 and 72 h post transfection (left panels). Mock transfected cells were used as a negative control. Western blotting with an anti- β -tubulin antibody (right panels) was performed to ensure that equal amounts of total cellular proteins were loaded in each lane.

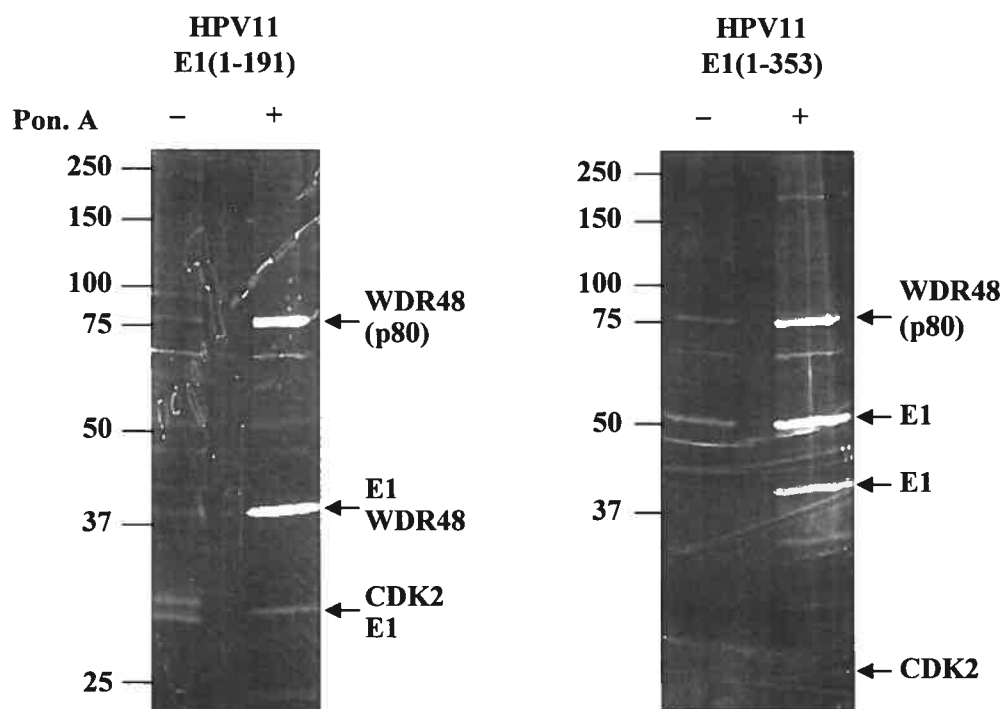
Figure 9. Maintenance and amplification of mutant HPV31 genomes in primary human keratinocytes. Southern blot analysis showing the status of the viral genome in HFK immortalized with either wild type HPV31 (WT) or mutant (m) derivatives bearing the indicated E1 amino acid substitutions that abrogate p80 binding. HPV31-immortalized HFK were induced to differentiate in methylcellulose-containing medium for 24 and 48 h, as indicated.

Figure 1

A



B

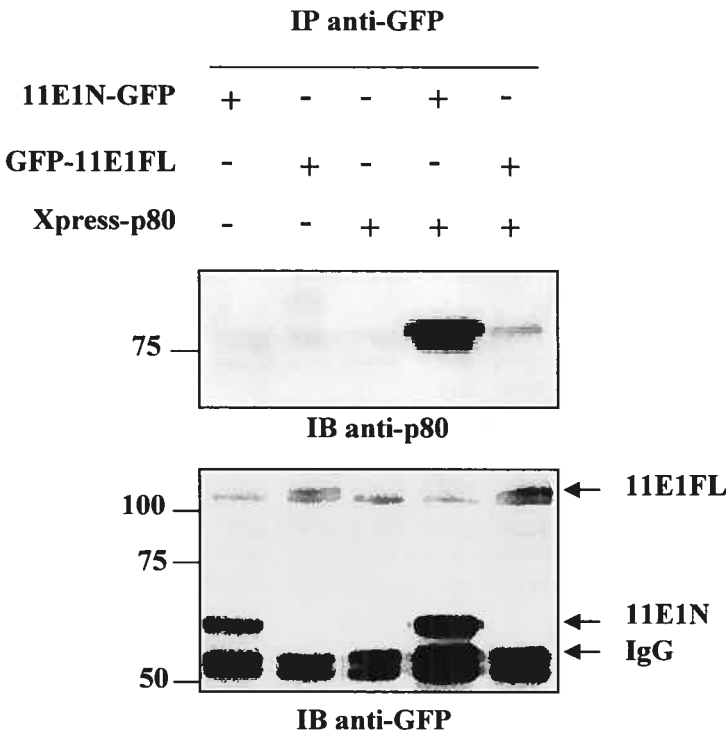


C

MAAHHRQNTAGRRKVQVS^YVIRDEVEKYNRNGVNALQOLDPALNRLFTAGRDSII
 RIWSVNQHKQDPYIASMEHHTDWVNDIVLCCNGKTLISASSD^TTVKVWNAHKGF
 CMSTLRTHKDYVKALAYAKDKELVASAGLDRQIFLWDVNTLTALTASNNTVTTS
 SLSGNKDSIYSLAMNQLGTIIVSGSTEKVLRVWDPRTC AKLMKLKGHTDNVKALL
 LNRDGTQCLSGSSDGTIRLWSLGOQORCIATYRVHDEGVWALQVND^AFTHVYSGG
 RDRKIYCTDLRNPDIRVLICEEKAPVLKMELDRSADPPPAIWVATTKSTV^NKWTLK
 GIHNFRASGDYDNDCTNPITPLCTQPDQVIKGGASIIQCHILNDKRHILTKD^TNNN
 VAYWDVLKACKVEDLGKVD^FFEDEIKKRFKMVYVPNWFSVDLKTGMLTITLDE
 SDCFAAWVSAK^DAGFSSPDGSDPKLNLGGLLQALLEYWP^RTHVNPMD^EEEN
 EVNHVNGEQENRVQKNGYFQVPPHTPVIFGEAGGRTLFRLLCRDSGG^ETES
 MLLNETVPQWVIDITVDKNMPKFNKIPFYLOPHASSGAKTLKKDRLSASDMLQ
 VRKVM^EHVYEKII^NLDNESOTTSSSNNEKPGEQEKEEDIAVLAEKIELLCQDQ
 VLDPNMDLRTVKHFIWKSGGDLTLHYRQKST

Figure 2

A



B

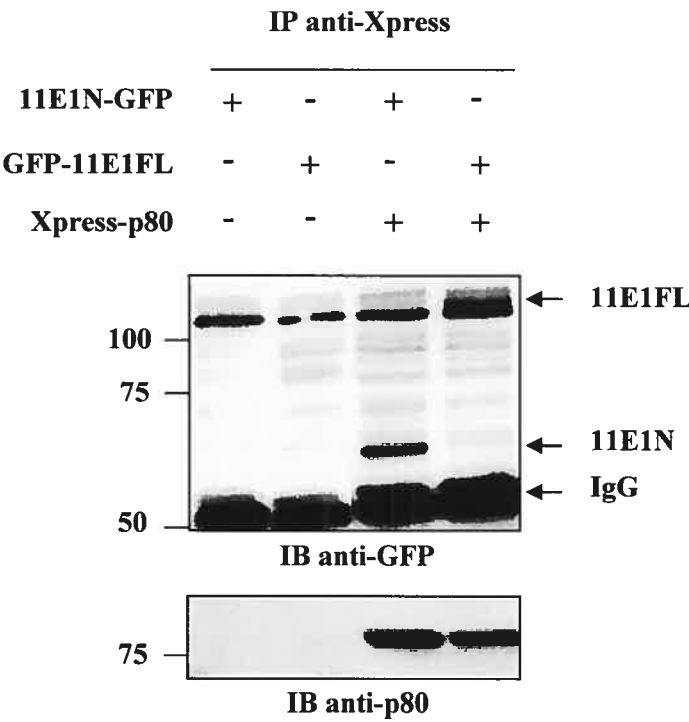
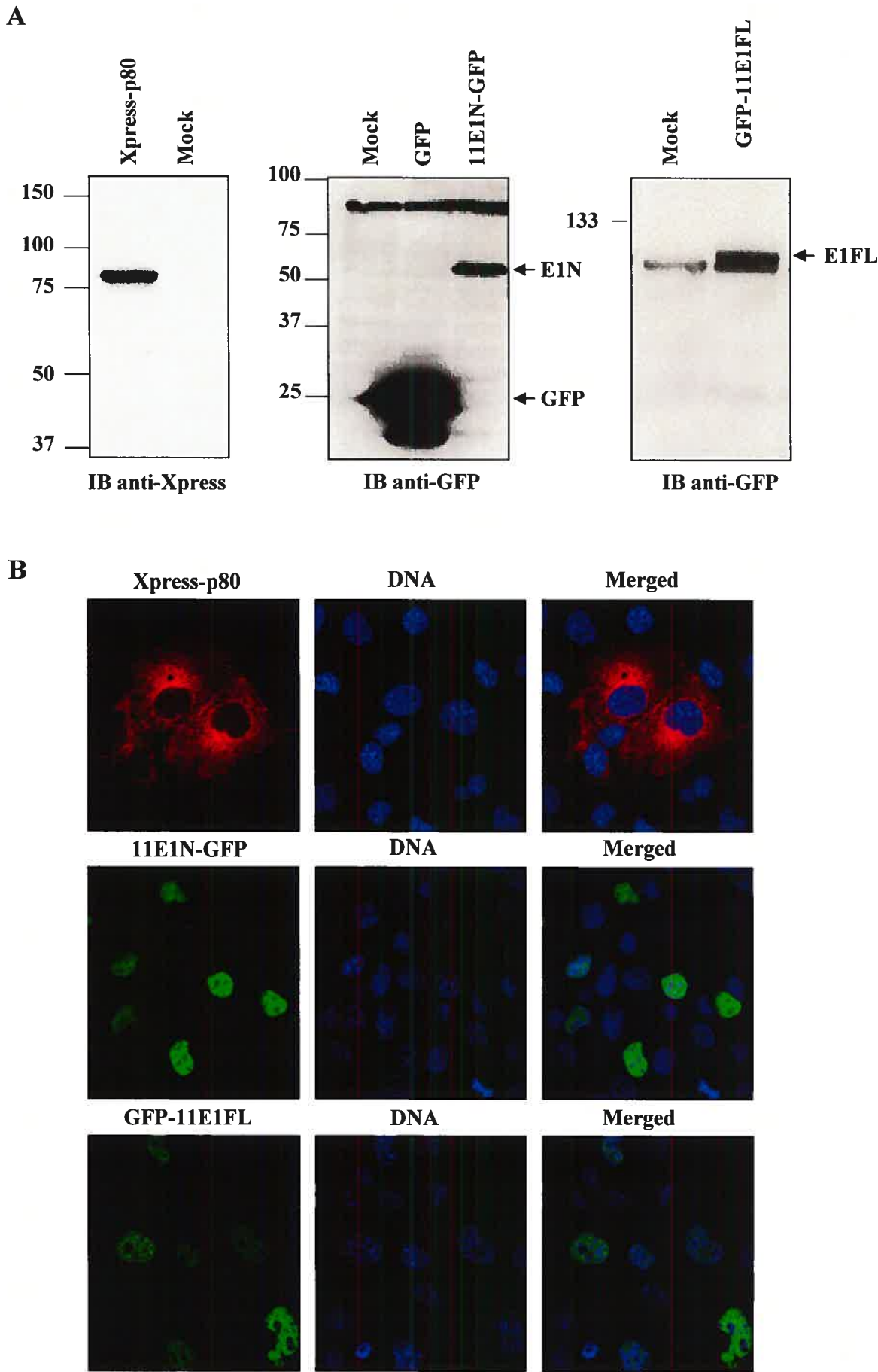


Figure 3



C

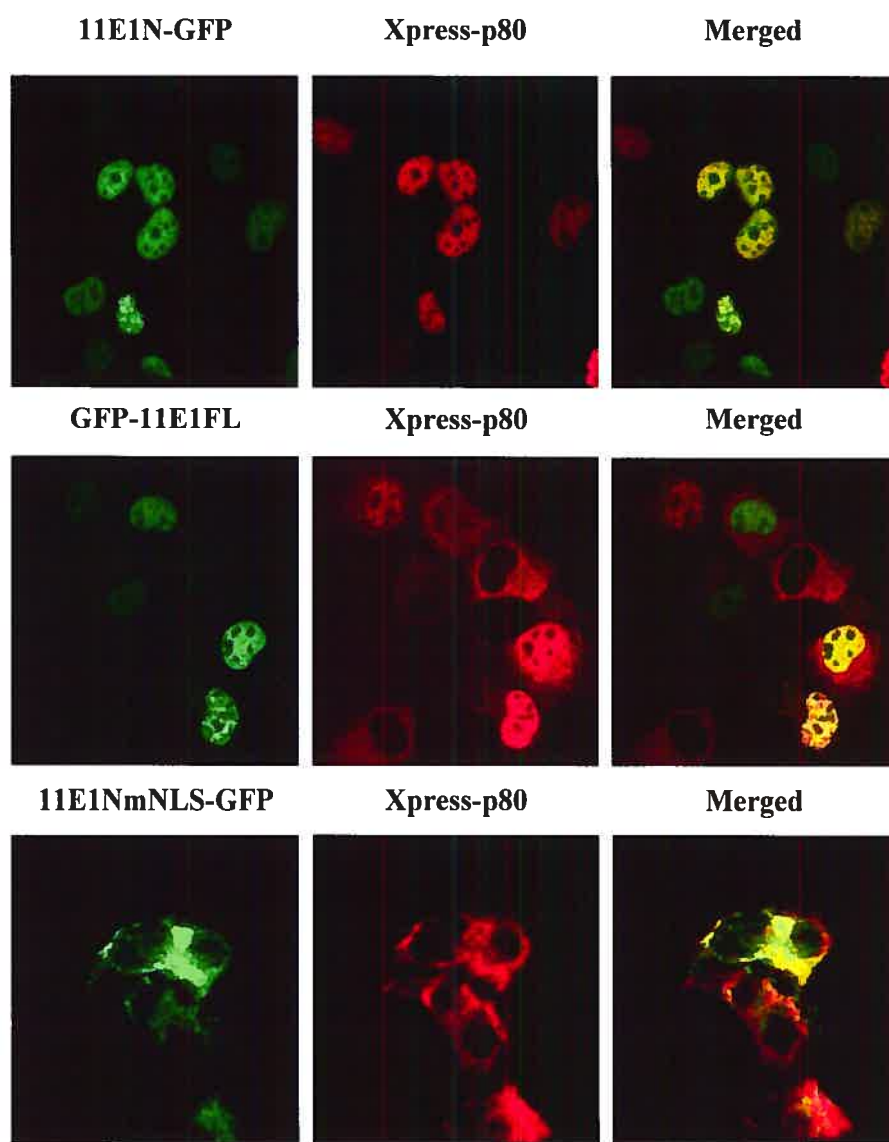
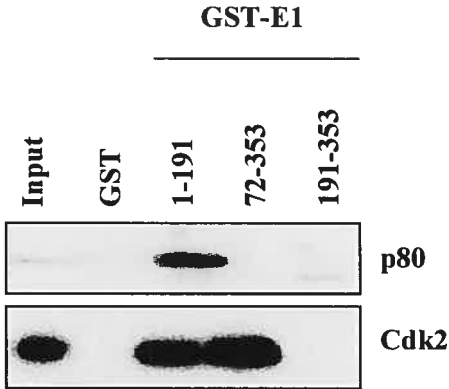
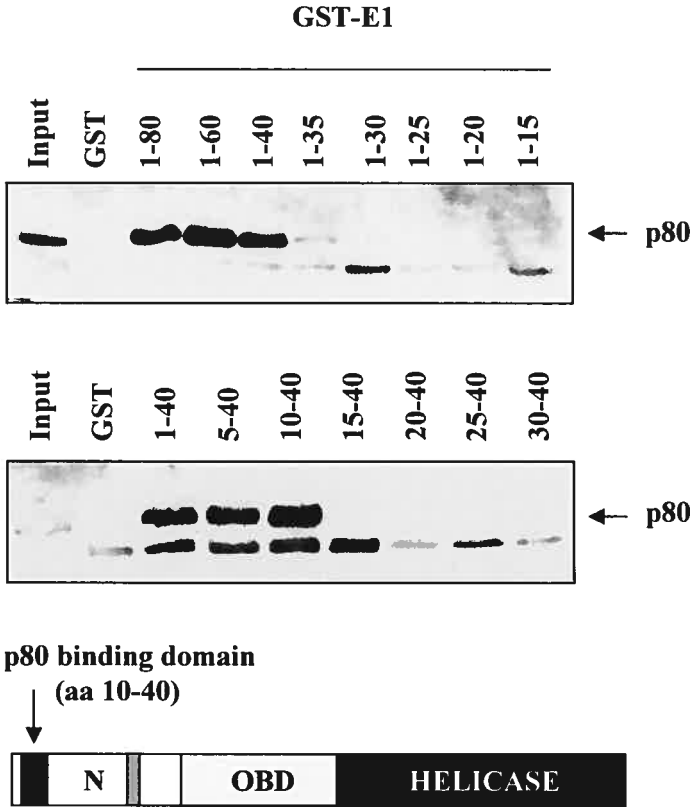


Figure 4

A



B



C

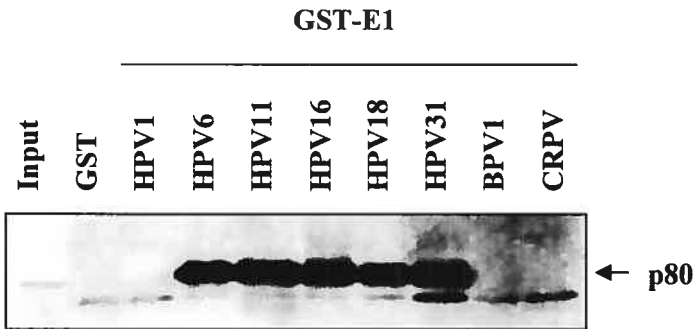
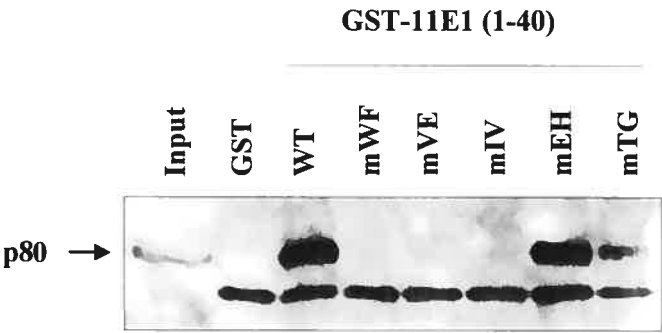


Figure 5

A

Mutants		AA		AA		AA	AA		AA	
HPV11	EGSGCTG	WF	M	VE	A	IV	EH	T	TG	TQISEDEEEEV
HPV6	EGSGCTG	WF	M	VE	A	IV	QH	P	TG	TQISDDEDEEV
HPV16	EGTGCNG	WF	Y	VE	A	VV	EK	K	TG	DAISDDENEND
HPV18	EGTGCNG	WF	Y	VQ	A	IV	DK	K	TG	DVISDDEDENA
HPV31	EGTGCNG	WF	Y	VE	A	VI	DR	Q	TG	DNISEDENEDS

B



C

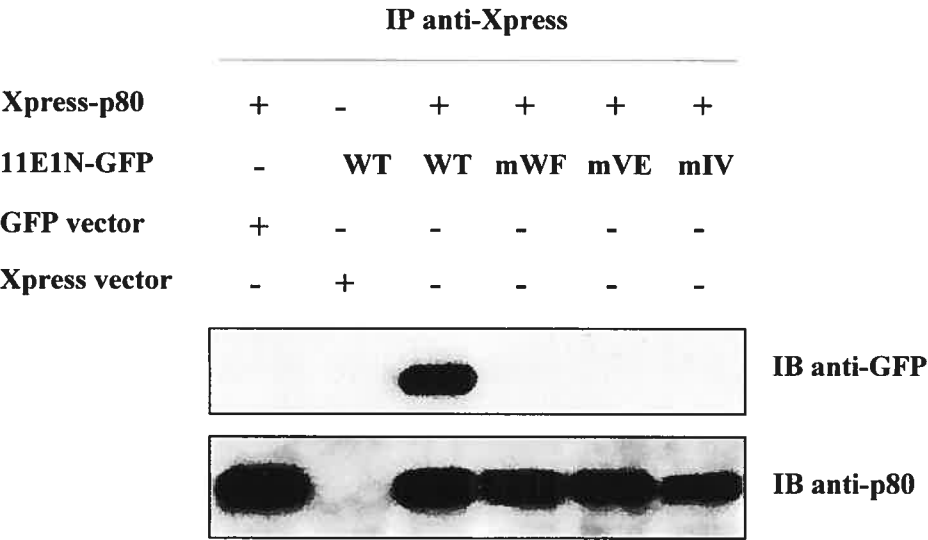
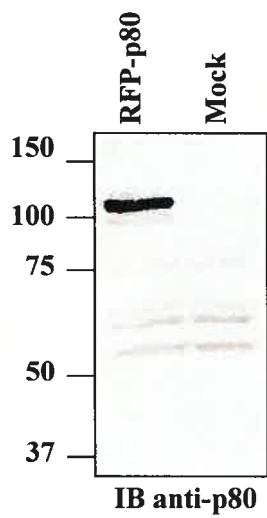


Figure 6

A



B

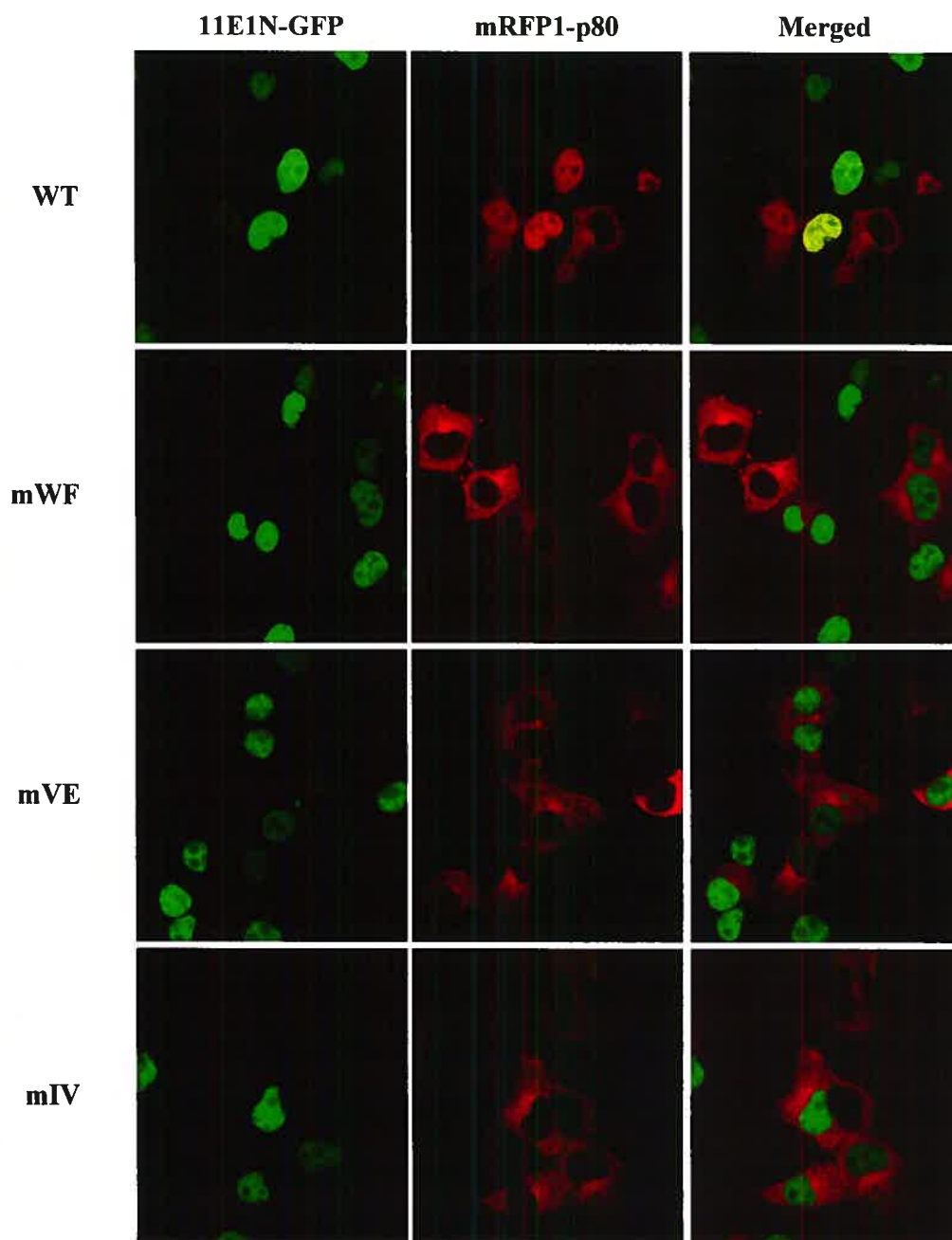


Figure 7

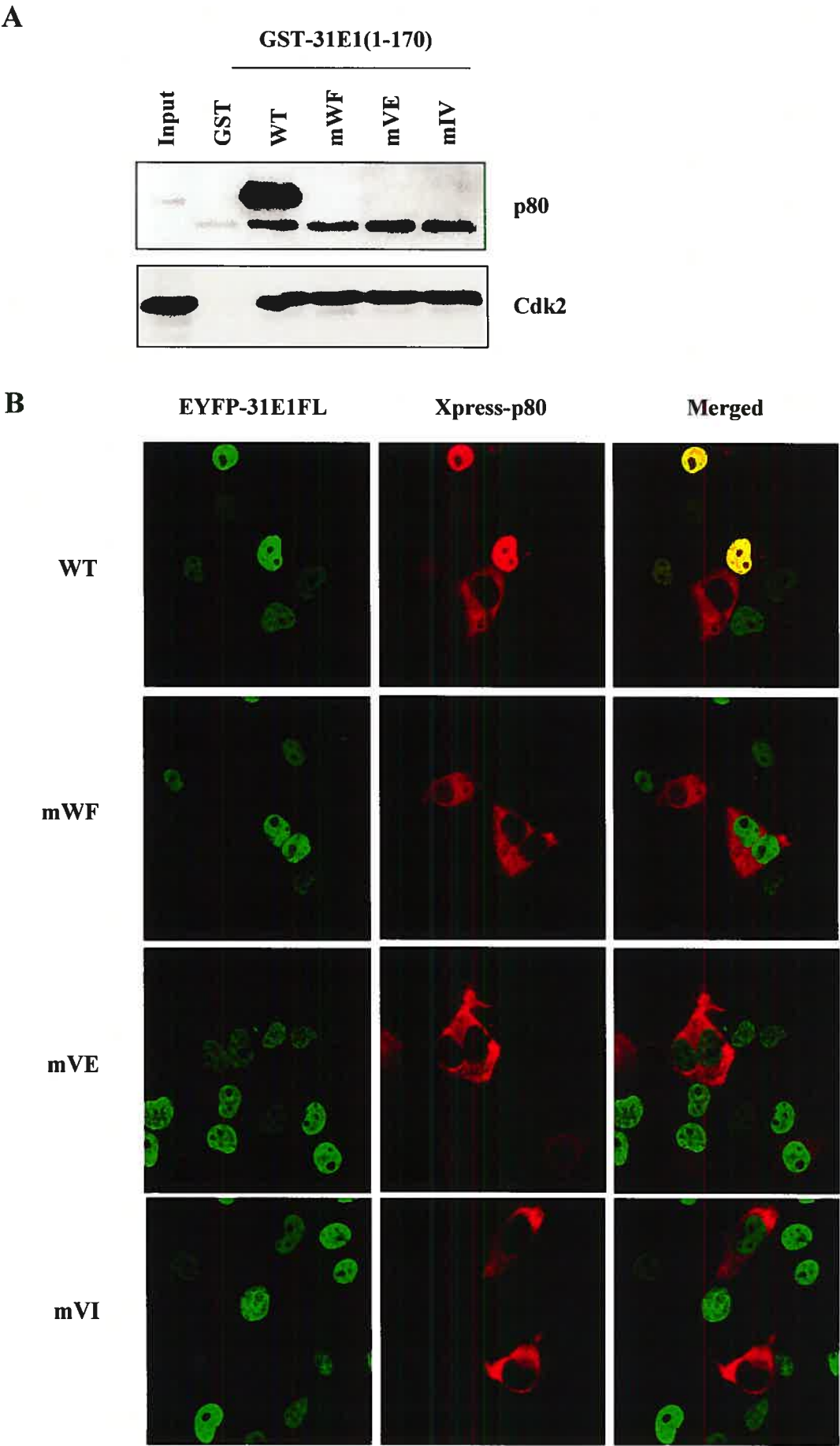
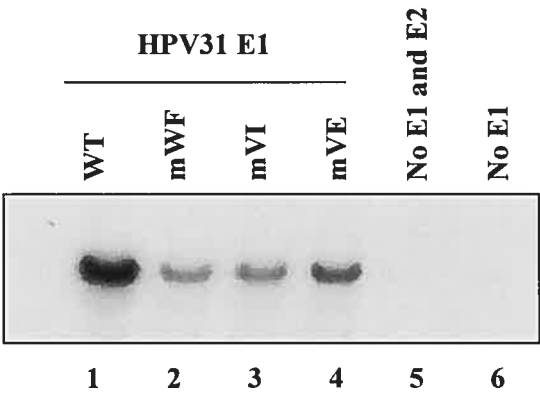


Figure 8

A



B

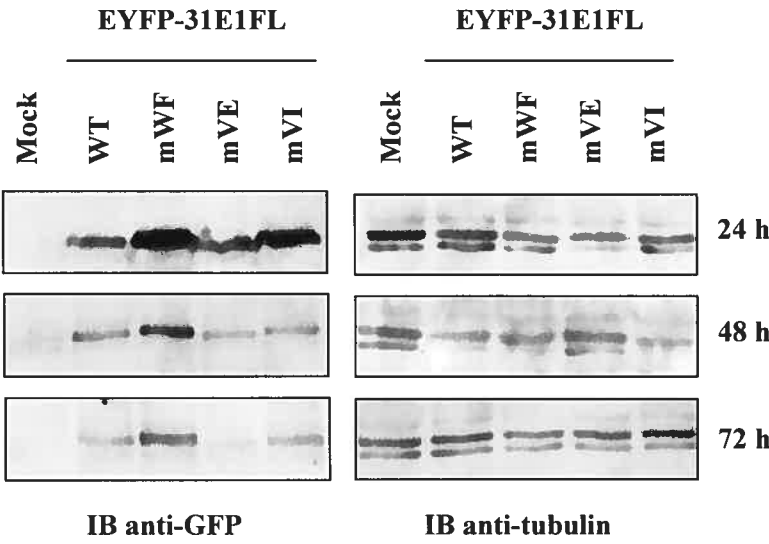
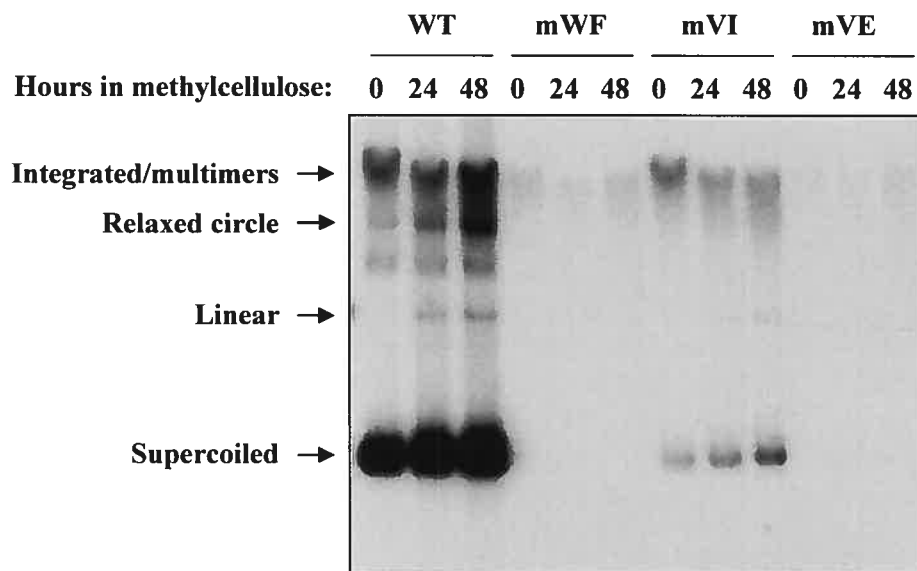


Figure 9



CHAPITRE III : Discussion

1. IDENTIFICATION DES PARTENAIRES CELLULAIRES DE L'HÉLICASE VIRALE E1

1.1. Purification des complexes protéiques contenant E1

Les hélicases virales telle E1 sont des protéines multifonctionnelles qui interagissent avec de multiples protéines cellulaires afin de détourner la machinerie de la cellule hôte en faveur de la réplication de leur génome. Afin de découvrir de nouveaux partenaires d'interaction d'HPV11 E1, différents domaines d'E1 ainsi que la protéine entière ont été exprimés en cellules sous le contrôle d'un promoteur inducible à l'ecdysone, puis les complexes associés à E1 purifiés par une double chromatographie d'affinité réalisée dans des conditions tentant de reproduire les valeurs physiologiques. On a ainsi pu isoler les complexes protéiques associés au domaine N-terminal et au DBD d'E1. Nos conditions n'ont toutefois pas permis la purification des complexes protéiques associés au domaine C-terminal ou à la protéine entière. L'étape problématique n'est pas exactement connue. Cependant, conformément à l'observation antérieure que la purification de la protéine HPV11 E1 recombinante nécessite de hautes concentrations de sels (250), il est possible que le domaine C-terminal tende à se lier de façon non spécifique à la résine. Une haute concentration de sel n'a toutefois pas été envisagée pour la double purification car elle aurait potentiellement interféré avec certaines interactions protéiques.

1.2. Protéines cellulaires identifiées

La double purification jumelée à l'analyse MS a permis d'identifier trois partenaires d'E1, soit la Cdk2, déjà connue pour interagir avec E1 via les cyclines A et E (144), ainsi que deux nouveaux partenaires potentiels : Ubr2 (bande migrant à environ 200 KDa à la figure 1 de l'article, p. 89) et p80. Ubr2 est une ubiquitine ligase de type E3 appartenant à la voie de dégradation des N-degrons, qui mène à l'ubiquitination et à la dégradation subséquente des protéines ayant un acide aminé déstabilisant à l'extrémité aminée ainsi qu'une lysine interne réceptrice pour la chaîne d'ubiquitine (revu dans (242)). L'interaction avec la protéine Ubr2 n'a cependant pu être confirmée dans des essais de « GST pulldown ». Ayant été identifiée à partir de la construction E1(1-353) qui présente des fragments protéolytiques (voir figure 1 de l'article, p. 89), il est possible qu'un des fragments produits contienne un N-degron, alors reconnu par Ubr2. Comme ces fragments ne sont pas observés lorsque cette construction est produite en bactéries, ceci pourrait expliquer le résultat négatif en « GST pulldown ». Alternativement, il est possible que l'interaction avec Ubr2 nécessite une certaine modification d'E1 qui ne se produit pas en bactéries.

En ce qui concerne p80, sa fonction cellulaire demeure inconnue à ce jour. Les données disponibles concernent son interaction avec la protéine virale Tip (« tyrosine kinase-interacting protein ») de *Herpesvirus Saimiri*, dont l'interaction semble favoriser la formation de vésicules lysosomiales (179). C'est une protéine de 677 acides aminés pour un poids théoriques d'environ 76,2 KDa. Les transcrits encodant p80 sont exprimés dans tous les tissus incluant la peau, avec une prédominance au niveau des ovaires, des testicules et de certaines régions du cerveau. Elle semble conservée chez les organismes supérieurs, avec la présence évidente d'une protéine homologue chez le singe, le bétail, le poulet, le rat, la souris et le poisson (voir l'alignement de séquences en annexe 1). En plus d'un domaine « coiled-coil » potentiel situé dans sa partie C-terminale, p80 est caractérisée par la présence de 7 ou 8 domaines WD répétés à son extrémité aminée. Un domaine WD est constitué d'environ 44-60 acides aminés dont un dipeptide GH situé 11-24 résidus

de la limite N-terminale du domaine, et les résidus WD terminant fréquemment la séquence. Toutefois, ceci n'est pas une règle absolue, tant que les acides aminés accommodent la structure caractéristique en « β -propellor ». Une telle structure ressemble à une hélice de bateau avec plusieurs lames, dont chaque lame est constituée de quatre brins antiparallèles en feuillet β . Un domaine WD constitue 3 brins d'une lame et le dernier brin de la lame adjacente. De cette façon, le dernier domaine WD complète le premier, refermant le module en une structure circulaire (figure 16, p. 100).

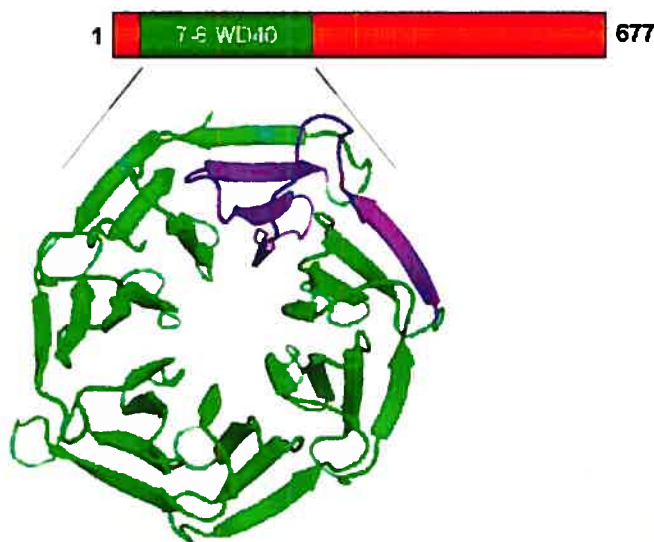


Figure 16 : Structure de la protéine p80. Constituée de 677 acides aminés, p80 est caractérisée par la présence de 7-8 domaines WD à son extrémité aminée. Ces domaines forment une structure en hélice de bateau dont chaque lame est composée d'un feuillet β de quatre brins antiparallèles. Un domaine WD (coloré en mauve sur l'illustration) couvre 3 brins d'une lame et un brin de la lame adjacente, caractéristique favorisant la circularisation de la structure. (D'après le cristal de la sous-unité β de la protéine G de Lodowski *et al.* (2003). *Science* **300**:1256-62 (138))

Les domaines WD procurent une plateforme rigide pour l'établissement de multiples interactions protéiques simultanées. Cette fonction est particulièrement importante chez les organismes complexes. La famille des domaines WD présente d'ailleurs une rapide expansion et diversification lors de l'évolution et est significativement augmentée dans le génome humain par comparaison aux autres génomes eucaryotes séquencés (133). Ainsi, bien que des protéines possédant des domaines WD aient été identifiées chez les procaryotes, celles-ci sont principalement retrouvées chez les eucaryotes où elles occupent de multiples fonctions essentielles (revu dans (133)).

1.3. Perspectives

1.3.1. Composition des complexes protéiques associés à E1 sur l'ADN

C'est sous forme d'hexamères encerclant l'ADN qu'E1 est active pour le déroulement du duplex d'ADN. C'est probablement aussi sous cette forme qu'elle interagit avec la machinerie de réplication cellulaire (4). Il serait par conséquent intéressant de purifier les complexes associés à E1 lorsqu'elle est sous sa forme oligomérisée. On pourrait donc utiliser soit la protéine entière, soit la portion C-terminale englobant le DBD et le domaine hélicase (portion minimale permettant la liaison stable à l'ori (236)). La même stratégie de TAP utilisée dans la présente étude pourrait être appliquée, avec quelques modifications : soit la transfection de plasmides contenant l'ori et E2, et l'ajout des étapes d'isolation de la fraction insoluble de l'extrait cellulaire (contient la chromatine et les protéines associées) et de re-solubilisation des complexes par fragmentation de l'ADN (traitement aux DNases), préalablement aux étapes de purification. Alternativement, l'expérience pourrait également être tentée par une approche de « GST pulldown » où de l'extrait cellulaire est ajouté à la forme hexamérisée d'E1. Notamment, une protéine E1 recombinante peut être spontanément purifiée sous forme d'hexamères, E1 étant présente sous cette forme en fonction de sa concentration lorsque purifiée de cellules

d'insectes (250). Aussi, l'hexamérisation d'E1 peut être stimulée par l'ajout d'ADNsb dans un tampon contenant de l'ATP-Mg²⁺ (236).

1.3.2. Protéines cellulaires interagissant avec le domaine N-terminal d'E1

Alors que le domaine N-terminal d'E1 des HPV est facultatif pour la réplication du génome *in vitro*, il a une fonction régulatrice essentielle *in vivo* (4, 223). Les mécanismes impliqués demeurent toutefois peu connus. Au laboratoire, on s'intéresse particulièrement aux modifications post-traductionnelles et aux interactions protéiques de ce domaine qui pourraient intervenir dans ce rôle essentiel de régulation de la protéine. Le TAP a permis d'identifier deux des partenaires cellulaires d'HPV11 E1. Afin de pousser l'investigation sur les partenaires protéiques du domaine N-terminal des PV, les chromatographies d'affinité réalisées avec les domaines N-terminaux des divers PV (figure 4 de l'article, p. 93) ont également été analysées sur SDS-PAGE pour vérifier la présence de partenaires protéiques. L'analyse MS des nouvelles bandes a notamment mené à l'identification d'une co-purification de la protéine TPR (« translocated promoter region ») avec le domaine N-terminal de CRPV E1 (annexe 2). TPR est une protéine formant des filaments intranucléaires associés au pore nucléaire. Elle est impliquée dans l'export nucléaire d'ARNm et de protéines. De façon intéressante, des études récentes indiquent que les protéines E1 voyagent entre les compartiments nucléaires et cytoplasmiques. Plus particulièrement, le domaine N-terminal des HPV contient une séquence régulant l'export nucléaire via CRM1 (46). BPV1 E1 a aussi été démontrée pour voyager entre les compartiments nucléaires et cytoplasmiques (98). Bien que l'interaction entre CRPV E1 et TPR doive préalablement être confirmée, il sera intéressant de vérifier si une telle navette régule également le niveau nucléaire de CRPV E1, et plus particulièrement si son export nucléaire dépend de l'interaction avec TPR.

1.3.3. Étude du rôle de la méthylation du domaine N-terminal d'E1

L'analyse par MS des protéines purifiées par TAP, plus particulièrement de la bande correspondant à E1, a révélé que la lysine 114 (K114) d'E1 présentait une diméthylation, et parfois même une triméthylation (à noter que cette modification pourrait aussi correspondre à un groupement acétyle). Cette lysine est située au niveau de la SEN (figure 11 de l'introduction, p. 36). Or, il a été démontré que la phosphorylation de sérines à l'intérieur ou près de la SEN inactive cette séquence et par conséquent, inhibe l'export nucléaire (46). La méthylation étant une modification plus stable que la phosphorylation, il serait intéressant de tester si cette modification pourrait être impliquée dans la rétention d'E1 au noyau à un certain stade viral. Dans un premier temps, il s'agirait donc de confirmer que cette lysine est également modifiée par méthylation dans les kératinocytes primaires et/ou différenciés (la différenciation peut être induite en cultivant les kératinocytes dans un milieu contenant du méthylcellulose) par l'analyse en spectrométrie de masse de la protéine E1 purifiée. Si tel est le cas, on pourrait alors tester l'hypothèse que la méthylation de K114 inactive la SEN en mutant cette lysine et en regardant l'impact sur la localisation intracellulaire d'E1 en microscopie et par fractionnement cellulaire suivi d'une analyse par immunobavardage de type Western. À cette fin, la fusion GFP d'HPV11 E1 utilisée dans cette étude pourra de nouveau servir. Aussi, la mutation de K114 pourrait se faire conjointement à la mutation du CBM précédemment décrite (RRL → RRA, (46)), cette dernière empêchant la liaison des cyclines et donc la phosphorylation des résidus qui a pour conséquence d'inactiver la SEN. De cette façon, l'effet de la méthylation de K114 sur la localisation intracellulaire d'E1 pourra être étudié dans le contexte d'une NES constitutivement active.

2. IDENTIFICATION D'UNE NOUVELLE INTERACTION ENTRE HPV E1 ET LA PROTÉINE CELLULAIRE P80

2.1. Caractérisation de l'interaction entre E1 et p80

L'interaction entre HPV11 E1 et p80, d'abord identifiée par TAP, a par la suite été confirmée par des expériences de « GST pulldown », co-immunoprécipitation et co-localisation cellulaire. On a également déterminé que cette interaction est conservée chez les HPV infectant les muqueuses et identifié trois doublets d'acides aminés d'E1 qui sont critiques à la liaison de p80.

Il ressort de ces expériences que l'interaction entre E1 et p80 est relativement forte et stable. Un des avantages du TAP est qu'il permet l'isolation de complexes formés en cellules et, effectuée dans des conditions où la protéine d'intérêt est exprimée à un niveau sensiblement physiologique, préserve donc la stoechiométrie des protéines à l'intérieur des complexes. De plus, la coloration au Sypro red, qui lie la couche de détergent (SDS) entourant les protéines, permet de corrélérer l'intensité de la fluorescence avec la masse de protéines dans des gels dénaturants, permettant l'appréciation quantitative du ratio de chaque protéine dans le complexe purifié (215, 216). On remarque que la bande de p80 est relativement intense dans les deux complexes purifiés (figure 1 de l'article, p. 89). En tenant compte que des peptides contaminants étaient également présents dans la bande contenant E1 dans le complexe d'HPV11 E1(1-353) (selon les résultats de l'analyse MS), p80 semble présent dans les complexes d'E1 dans un ratio s'approchant du 1:1. Il est à noter toutefois que ces complexes sont obtenus avec des portions d'E1 qui ne comportent notamment pas le domaine d'oligomérisation et ne peuvent donc pas lier l'ADN de manière stable (236). Ces résultats indiquent donc qu'une bonne proportion d'E1 est donc potentiellement associée à p80 en cellules lorsqu'E1 est monomérique en solution. On ne peut toutefois rien conclure quant à l'interaction de p80 avec E1 lorsqu'elle est hexamérisée sur l'ADN.

Dans la même optique, on remarque qu'une bonne proportion de p80 contenue dans l'extrait cellulaire est retenue par E1 dans les essais de « GST pulldown » (figures 4, 5 et 7 de l'article; la colonne « input » des gels contient 0,5-1% de l'extrait cellulaire passé sur chaque colonne). De plus, la résistance de l'interaction aux lavages lors des différentes chromatographies et l'efficace re-localisation de p80 au noyau suite à son interaction avec E1 constituent davantage d'arguments en faveur d'une interaction stable.

Coïncidence intéressante, les acides aminés critiques à l'interaction de p80 se situent dans une courte région qui, par informatique computationnelle, est prédite pour se replier en feuillet β (193, 194). La plupart des acides aminés de cette région sont d'ailleurs des résidus non polaires, lesquels sont généralement retrouvés à l'intérieur de la protéine plutôt qu'exposés en surface et donc impliqués dans des poches d'interactions hydrophobiques. Ces observations suggèrent donc que l'interaction se produirait via une interface hydrophobique et impliquerait potentiellement un feuillet β .

2.2. Relevance biologique de l'interaction entre E1 et p80

2.2.1. Impact de l'interaction sur les fonctions répliquatives d'E1

Afin d'étudier l'importance de l'interaction entre E1 et p80 dans la pathogenèse des HPV génitaux, on a utilisé les substitutions d'E1 préalablement identifiées pour abroger l'interaction avec p80 afin d'étudier l'impact d'une suppression de l'interaction sur les fonctions répliquatives d'E1. On s'est d'abord assuré que les mutations n'affectaient pas outre mesure l'intégrité des protéines E1 mutantes en confirmant que l'interaction avec la Cdk2 était préservée et que les protéines mutantes s'accumulaient normalement au noyau (figure 7 de l'article, p. 96). Les mutations ont subséquemment été introduites dans le génome d'HPV31 afin d'étudier l'effet de l'abrogation de l'interaction sur le maintien et l'amplification du génome viral dans des kératinocytes primaires, l'hôte naturel des HPV. Alors que l'abrogation de l'interaction ne semble pas affecter l'amplification de l'épisode suite

à la différenciation des kératinocytes, on a observé que le nombre de copies de génomes viraux était significativement réduit dans les cellules contenant les génomes mutés. Ces résultats suggèrent une implication de p80 dans le contrôle du nombre de copie dans les kératinocytes non différenciés. Une telle réduction du nombre de copies peut résulter soit d'une réplication sub-optimale, soit de la perte des génomes lors des divisions cellulaires. Les différentes possibilités du niveau d'action de p80 dans la pathogenèse de HPV sont discutées dans l'article (section discussion, p. 79).

2.2.2. Mise en contexte de l'interaction dans le cycle viral

Récemment, une collaboration entre le laboratoire du Dr L. Laimins à Chicago et le nôtre a mis en évidence un site de clivage pour la caspase-3 (motif DxxD) aux acides aminés 46-49 d'E1, un site conservé chez la plupart des HPV. De plus, il a été démontré que la caspase-3 est activée lors de la différenciation des kératinocytes contenant le génome d'HPV31. La mutation du site de clivage ou encore l'inhibition des caspases affectent tous deux l'amplification du génome viral (157). Donc, il est possible que le clivage des 50 premiers acides aminés soit requis pour l'amplification du génome viral. Cette observation suggère qu'un élément impliquant l'extrémité aminée pourrait restreindre l'amplification de génome dans les premières couches cellulaires, restriction qui serait par la suite éliminée par le clivage d'E1 lors de l'activation de la caspase-3 dans les kératinocytes différenciés. Or, le seul événement connu à ce jour impliquant ces premiers 50 acides aminés est l'interaction avec p80. On pourrait donc croire que le clivage pourrait servir à éliminer p80, dont l'interaction avec E1 est plutôt forte et stable. À priori, p80 ne semble toutefois pas être un élément répresseur de l'amplification puisque l'inhibition de l'interaction n'induit pas l'amplification du génome dans les cellules non différenciées. Néanmoins, il est possible que d'autres éléments répresseurs limitent l'amplification du génome dans les premières couches cellulaires, ou encore que p80 soit un élément répresseur uniquement dans le contexte cellulaire des kératinocytes différenciés. Nos résultats sont d'ailleurs compatibles avec un modèle où E1 serait

clivée par la caspase-3 suite à la différenciation des kératinocytes, les mutations inhibant la liaison de p80 n'ayant pas d'effet sur l'amplification du génome, ce qui concorde avec un modèle où l'interaction serait de toute façon éliminée suite au clivage d'E1. Il se peut également que l'effet du clivage d'E1 sur l'amplification du génome viral ne soit pas dû à p80. Un autre élément pourrait être responsable de cet effet, ou encore le clivage d'E1 pourrait modifier certaines de ses propriétés. Notamment, une protéine dont les 72 premiers acides aminés sont tronqués présente une affinité accrue pour l'ori *in vitro* (236). Le clivage de l'extrémité N-terminale d'E1 pourrait donc avoir un effet sur la liaison à l'ADN, ou encore sur l'assemblage d'E1 sur l'ori.

Curieusement, alors que le domaine N-terminal est facultatif pour la réplication du génome *in vitro*, la troncation des 80 premiers acides aminés affecte grandement cette fonction dans des essais de réplication transitoire en cellules (223). Pourtant, aucune des sérines dont la phosphorylation est requise à la rétention nucléaire (et donc à la réplication efficace du génome) ne sont contenues dans cette portion, ni les séquences de régulation à ce jour identifiées (SLN, SEN et CBM). Donc, il est probable qu'une modification post-traductionnelle ou encore une interaction avec une protéine cellulaire au niveau de ces 80 premiers acides aminés soit importante pour la régulation de la réplication du génome *in vivo*. De façon intéressante, les seuls éléments connus concernant ces acides aminés sont la liaison de p80 et la présence du site de clivage de la caspase-3. Puisque la caspase-3 n'est probablement pas activée dans les cellules lors des essais de réplication transitoire, il est possible que l'interaction avec p80 soit requise de manière directe ou indirecte à la réplication, conformément à nos observations que l'abrogation de l'interaction avec p80 affecte la maintenance des génomes viraux.

2.3. Perspectives

2.3.1. Effet de p80 sur la stabilité d'E1 et la réplication du génome viral

Au cours des études, on a remarqué que certaines des protéines E1 mutantes semblaient présenter en plus grande quantité que la protéine sauvage dans les cellules. On a donc dans un premier temps exprimé E1 de façon transitoire dans des cellules 293 et regardé la quantité d'E1 présente dans des extraits cellulaires totaux par immunobavardage de type Western (annexe 3). Deux des mutants sont alors apparus être davantage abondants que la protéine de type sauvage. Afin de vérifier si cette accumulation est due à une plus forte expression ou à une stabilisation de la protéine, il serait intéressant de comparer la demi-vie des protéines E1 mutantes à la protéine de type sauvage dans des essais de « pulse-chase ». Une demi-vie augmentée pour les protéines mutantes suggérerait un rôle de p80 dans la dégradation d'E1.

Afin de vérifier l'hypothèse que l'interaction entre E1 et p80 influence la réplication du génome viral et/ou la stabilité d'E1, il serait intéressant d'étudier l'effet d'une surexpression ou encore d'une diminution de l'expression de p80 sur ces paramètres via l'utilisation d'un vecteur d'expression de p80 et d'un ARN interférent (siRNA) respectivement. L'utilisation du siRNA pour interférer avec la production de p80 pourrait notamment permettre de reproduire les résultats concernant le maintien des génomes viraux et le niveau cellulaire d'E1 en utilisant une protéine E1 de type sauvage. En effet, on ne peut exclure à ce stade que les phénotypes ne sont pas dus aux mutations proprement dites ou à une modification de l'expression des protéines virales dans le contexte génomique. Les protéines virales sont produites à partir d'ARNm polycistroniques et, tel qu'abordé à la section 3.1.1. de l'introduction, l'expression des protéines virales est très complexe et régulée par de multiples signaux. Bien que les mutations ne soient pas au niveau d'un site d'épissage documenté, elles pourraient affecter un signal de régulation affectant par exemple l'efficacité d'épissage, et donc modifier l'abondance ou le ratio des différentes protéines virales. Toutefois, l'observation d'un même défaut de maintien des épisomes viraux pour les trois mutants argumente en défaveur d'un artefact.

Enfin, concernant une implication potentielle de p80 dans la réplication du génome viral, des essais de réplifications transitoires sont en cours dans le laboratoire du Dr L. Laimins afin de comparer les capacités réplcatives de nos protéines E1 mutantes par rapport à la protéine de type sauvage. Lors de ces essais, les vecteurs d'expression d'E1 et E2 sont transfectés avec un plasmide contenant l'ori. Suite à l'élimination des plasmides transfectés par digestion avec Dpn I, les génomes répliqués en cellules sont quantifiés par immunobavardage de type Southern. Les résultats préliminaires indiquent que les protéines E1 mutantes sont aussi performantes que la protéine de type sauvage dans ces essais où E1 et E2 sont surexprimées. Il apparaît donc que les mutants sont compétents pour la réplication du génome viral et il est donc possible que le défaut observé dans les kératinocytes soit plutôt dû à un changement de la quantité d'E1 au niveau des foyers de réplication, ou encore qu'une surexpression d'E1 peut compenser le défaut engendré par l'inhibition de la liaison de p80.

2.3.2. Éluclider la fonction cellulaire de p80

Afin de poser des hypothèses sur la fonction de l'interaction entre E1 et p80 dans la pathogenèse des HPV, il serait utile de connaître la fonction cellulaire de p80. Tout d'abord, une façon d'obtenir des indices sur son rôle au sein de la cellule serait d'identifier ses partenaires d'interactions, dont la fonction pourrait nous diriger vers une certaine voie cellulaire. Surtout qu'il est justifié de croire que p80 interagit avec plusieurs protéines cellulaires, les protéines à domaines WD étant considérées comme des plateformes d'interactions pour l'établissement de plusieurs interactions protéiques simultanées. P80 pourrait donc potentiellement servir de médiateur pour recruter une/des protéine(s) cellulaire(s) utile(s) à la fonction d'E1. Dans un premier effort pour identifier des partenaires de p80, on a profité de la bonne rétention de p80 par le peptide d'HPV11 E1(1-40) dans les essais de « GST pulldown » (figure 5 de l'article, p. 94). Selon le raisonnement qu'en abolissant la liaison de p80 avec E1, les protéines associées à p80 seraient alors absentes du complexe purifié à partir d'E1, on

a utilisé une approche de « GST pulldown » pour identifier des protéines co-purifiées avec le fragment de type sauvage mais absentes des complexes d'un peptide E1 muté pour l'interaction avec p80. Cette stratégie a mené à l'identification de la protéine DDX1 (annexe 4). L'expérience en « GST pulldown » ayant été réalisée avec un seul des trois mutants qui inhibent la liaison de p80, on a par la suite voulu confirmer que l'interaction de DDX1 dépend de p80 en testant les trois doubles mutants. Ces tests de confirmation ont toutefois révélé que les deux autres mutants qui ne lient pas p80 interagissent tout de même avec DDX1, qui n'est donc pas un partenaire de p80 (annexe 4). DDX1 demeure néanmoins un partenaire potentiel d'HPV E1. DDX1 est une ARN hélicase qui possède le motif Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) caractéristique de la famille des « DEAD box ». Sa fonction cellulaire n'est pas encore bien comprise, mais les ARN hélicases de cette famille sont impliquées dans divers procédés demandant une altération de la structure d'ARN, incluant l'épissage, la dégradation et la stabilité des ARN, ou encore l'initiation de la traduction. DDX1 a d'ailleurs été reportée pour intervenir dans le cycle reproductif viral de HIV et de JCV, en ayant un impact sur la transcription ou sur la réplication (64, 65, 224). Enfin, dans le même but d'identifier les partenaires d'interactions de p80, une étudiante au laboratoire produit présentement des lignées stables de p80 en fusion au peptide TAP afin de purifier les complexes cellulaires associés à p80 en cellules.

Puisque p80 est relocalisée au noyau par E1, il serait intéressant de vérifier si certaines conditions induisent la redistribution de p80 au noyau en l'absence d'E1. Si p80 a une fonction au niveau du noyau lors de l'infection virale, il est probable que cette même fonction soit mise à profit lors de certaines conditions/stress cellulaires. Trouver une situation où p80 est redistribuée au noyau fournirait ainsi d'autres indices sur la fonction cellulaire de p80. Il demeure toutefois possible que l'interaction serve à contrecarrer la fonction cytoplasmique de p80 en modifiant sa localisation cellulaire. Advenant l'identification d'une condition où p80 serait nucléaire, celle-ci pourrait être utilisée dans une expérience de TAP. Selon l'application ou non de la condition, on pourrait ainsi identifier les complexes

protéiques cytoplasmiques et nucléaires associés à p80. Alternativement, une SLN pourrait être ajoutée à p80 afin de purifier les complexes associés à p80 au noyau. Enfin, mentionnons que les études cellulaires mentionnées à la section précédente où p80 est surexprimée ou diminuée ont le potentiel de causer certains phénotypes, lesquels pourraient également nous renseigner sur la fonction cellulaire de p80.

CONCLUSION

Dans le but d'identifier les partenaires cellulaires de l'hélicase virale E1 d'HPV11, les complexes protéiques associés à différents domaines d'E1 en cellules ont été purifiés par double chromatographie d'affinité. L'analyse par spectrométrie de masse des protéines ainsi purifiées et les expériences subséquentes ont permises de confirmer l'interaction du domaine N-terminal d'E1 avec la Cdk2, et également d'identifier un nouveau partenaire d'interaction en la protéine à domaines WD p80. Par la suite, il a été démontré que p80 interagit avec les 40 premiers acides aminés d'E1, et que cette interaction est conservée et exclusive aux HPV qui infectent la région génitale. Bien que p80 soit cytoplasmique dans des conditions normales et qu'E1 soit principalement nucléaire, les deux protéines co-localisent dans les cellules, p80 étant redistribuée au noyau de façon dépendante à son interaction avec E1. Les premiers essais fonctionnels indiquent que l'interaction avec p80 est requise pour le maintien optimal du nombre de copies de génomes viraux dans les kératinocytes non différenciés.

L'interaction découverte dans la présente étude implique le domaine N-terminal d'HPV E1, qui apparaît aujourd'hui constituer un module de régulation de la protéine primordial à sa fonction *in vivo*. On y retrouve les séquences d'import et d'export nucléaires, des sites de phosphorylation, un motif de liaison des cyclines et, selon les récentes découvertes, un motif DxxD pour le clivage par la caspase-3 (157) et un site de liaison pour p80. L'interaction avec p80 s'étant révélée importante pour le maintien des épisomes viraux, les futures études permettront ainsi de déterminer l'implication de cette protéine cellulaire dans la pathogenèse des HPV génitaux. De plus, les études portant sur p80 ouvrent la voie à la découverte d'un nouveau mécanisme utilisé par une protéine initiatrice virale pour assurer la réplication efficace du génome viral ainsi qu'à l'approfondissement de nos connaissances sur la fonction d'une protéine cellulaire jusqu'alors peu connue. Globalement, l'étude ici

présentée de concert avec les expériences proposées s'inscrivent dans une démarche visant la compréhension des événements moléculaires impliqués dans la réplication de l'ADN des HPV. Ainsi, l'étude de l'interface entre la protéine initiatrice virale E1 et la cellule hôte permet de mieux comprendre comment E1, par sa régulation et son interaction avec les protéines de la cellule hôte, assure la réplication optimale du génome viral.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Abbate, E. A., J. M. Berger, and M. R. Botchan.** 2004. The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev* **18**:1981-96.
2. **Ai, W., E. Toussaint, and A. Roman.** 1999. CCAAT displacement protein binds to and negatively regulates human papillomavirus type 6 E6, E7, and E1 promoters. *J Virol* **73**:4220-9.
3. **Allen-Hoffmann, B. L., S. J. Schlosser, C. A. Ivarie, C. A. Sattler, L. F. Meisner, and S. L. O'Connor.** 2000. Normal growth and differentiation in a spontaneously immortalized near-diploid human keratinocyte cell line, NIKS. *J Invest Dermatol* **114**:444-55.
4. **Amin, A. A., S. Titolo, A. Pelletier, D. Fink, M. G. Cordingley, and J. Archambault.** 2000. Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology* **272**:137-50.
5. **Ashrafi, G. H., M. R. Haghshenas, B. Marchetti, P. M. O'Brien, and M. S. Campo.** 2005. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer* **113**:276-83.
6. **Auborn, K. J., R. D. Little, T. H. Platt, M. A. Vaccariello, and C. L. Schildkraut.** 1994. Replicative intermediates of human papillomavirus type 11 in laryngeal papillomas: site of replication initiation and direction of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7340-4.
7. **Auster, A. S., and L. Joshua-Tor.** 2004. The DNA-binding domain of human papillomavirus type 18 E1. Crystal structure, dimerization, and DNA binding. *J Biol Chem* **279**:3733-42.
8. **Baker, T. S., W. W. Newcomb, N. H. Olson, L. M. Cowsert, C. Olson, and J. C. Brown.** 1991. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* **60**:1445-56.
9. **Barksdale, S., and C. C. Baker.** 1995. Differentiation-specific alternative splicing of bovine papillomavirus late mRNAs. *J Virol* **69**:6553-6.
10. **Becker, K. A., L. Florin, C. Sapp, G. G. Maul, and M. Sapp.** 2004. Nuclear localization but not PML protein is required for incorporation of the papillomavirus minor capsid protein L2 into virus-like particles. *J Virol* **78**:1121-8.
11. **Becker, K. A., L. Florin, C. Sapp, and M. Sapp.** 2003. Dissection of human papillomavirus type 33 L2 domains involved in nuclear domains (ND) 10 homing and reorganization. *Virology* **314**:161-7.
12. **Bedell, M. A., J. B. Hudson, T. R. Golub, M. E. Turyk, M. Hosken, G. D. Wilbanks, and L. A. Laimins.** 1991. Amplification of human papillomavirus

- genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J Virol* **65**:2254-60.
13. **Bernard, B. A., C. Bailly, M. C. Lenoir, M. Darmon, F. Thierry, and M. Yaniv.** 1989. The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* **63**:4317-24.
 14. **Blachon, S., S. Bellanger, C. Demeret, and F. Thierry.** 2005. Nucleocytoplasmic shuttling of high risk human Papillomavirus E2 proteins induces apoptosis. *J Biol Chem* **280**:36088-98.
 15. **Bossis, G., and F. Melchior.** 2006. SUMO: regulating the regulator. *Cell Div* **1**:13.
 16. **Bousarghin, L., A. Touze, P. Y. Sizaret, and P. Coursaget.** 2003. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol* **77**:3846-50.
 17. **Bravo, I. G., and A. Alonso.** 2006. Phylogeny and evolution of papillomaviruses based on the E1 and E2 proteins. *Virus Genes*.
 18. **Brehm, A., S. J. Nielsen, E. A. Miska, D. J. McCance, J. L. Reid, A. J. Bannister, and T. Kouzarides.** 1999. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *Embo J* **18**:2449-58.
 19. **Brown, D. R., D. Kitchin, B. Qadadri, N. Neptune, T. Batteiger, and A. Ermel.** 2006. The human papillomavirus type 11 E1--E4 protein is a transglutaminase 3 substrate and induces abnormalities of the cornified cell envelope. *Virology* **345**:290-8.
 20. **Burnett, T. S., and J. P. Sleeman.** 1984. Uneven distribution of methylation sites within the human papillomavirus la genome: possible relevance to viral gene expression. *Nucleic Acids Res* **12**:8847-60.
 21. **Butz, K., and F. Hoppe-Seyler.** 1993. Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J Virol* **67**:6476-86.
 22. **Castella, S., G. Bingham, and C. M. Sanders.** 2006. Common determinants in DNA melting and helicase-catalysed DNA unwinding by papillomavirus replication protein E1. *Nucleic Acids Res* **34**:3008-19.
 23. **Chen, G., and A. Stenlund.** 1998. Characterization of the DNA-binding domain of the bovine papillomavirus replication initiator E1. *J Virol* **72**:2567-76.
 24. **Chen, G., and A. Stenlund.** 2001. The E1 initiator recognizes multiple overlapping sites in the papillomavirus origin of DNA replication. *J Virol* **75**:292-302.
 25. **Chen, G., and A. Stenlund.** 2002. Sequential and ordered assembly of E1 initiator complexes on the papillomavirus origin of DNA replication generates progressive structural changes related to melting. *Mol Cell Biol* **22**:7712-20.

26. **Chen, X. S., R. L. Garcea, I. Goldberg, G. Casini, and S. C. Harrison.** 2000. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* **5**:557-67.
27. **Chiang, C. M., T. R. Broker, and L. T. Chow.** 1991. An E1M--E2C fusion protein encoded by human papillomavirus type 11 is a sequence-specific transcription repressor. *J Virol* **65**:3317-29.
28. **Chiang, C. M., M. Ustav, A. Stenlund, T. F. Ho, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 1992. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:5799-803.
29. **Choe, J., P. Vaillancourt, A. Stenlund, and M. Botchan.** 1989. Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: structural and functional analysis of new viral cDNAs. *J Virol* **63**:1743-55.
30. **Chow, L. T., M. Nasser, S. M. Wolinsky, and T. R. Broker.** 1987. Human papillomavirus types 6 and 11 mRNAs from genital condylomata acuminata. *J Virol* **61**:2581-8.
31. **Clower, R. V., J. C. Fisk, and T. Melendy.** 2006. Papillomavirus E1 protein binds to and stimulates human topoisomerase I. *J Virol* **80**:1584-7.
32. **Cole, C. N., and S. Conzen.** 2001. Polyomaviridae: The Viruses and Their Replication. *In* D. Knipe, Howley, P et al. (ed.), *Fields virology*, 4 ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
33. **Conger, K. L., J. S. Liu, S. R. Kuo, L. T. Chow, and T. S. Wang.** 1999. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* **274**:2696-705.
34. **Conrad, M., V. J. Bubb, and R. Schlegel.** 1993. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* **67**:6170-8.
35. **Cueille, N., R. Nougarede, F. Mechali, M. Philippe, and C. Bonne-Andrea.** 1998. Functional interaction between the bovine papillomavirus virus type 1 replicative helicase E1 and cyclin E-Cdk2. *J Virol* **72**:7255-62.
36. **Dao, L. D., A. Duffy, B. A. Van Tine, S. Y. Wu, C. M. Chiang, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 2006. Dynamic localization of the human papillomavirus type 11 origin binding protein E2 through mitosis while in association with the spindle apparatus. *J Virol* **80**:4792-800.
37. **Davy, C., and J. Doorbar.** 2005. *Human Papillomavirus : Methods and Protocols*, vol. 119. humana Press, New Jersey.
38. **Day, P. M., C. C. Baker, D. R. Lowy, and J. T. Schiller.** 2004. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:14252-7.
39. **Day, P. M., D. R. Lowy, and J. T. Schiller.** 2003. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* **307**:1-11.
40. **Day, P. M., R. B. Roden, D. R. Lowy, and J. T. Schiller.** 1998. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major

- capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* **72**:142-50.
41. **de Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard, and H. zur Hausen.** 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**:17-27.
 42. **Demeret, C., C. Desaintes, M. Yaniv, and F. Thierry.** 1997. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J Virol* **71**:9343-9.
 43. **Demeret, C., A. Garcia-Carranca, and F. Thierry.** 2003. Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein. *Oncogene* **22**:168-75.
 44. **Demeret, C., M. Le Moal, M. Yaniv, and F. Thierry.** 1995. Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors. *Nucleic Acids Res* **23**:4777-84.
 45. **Deng, W., G. Jin, B. Y. Lin, B. A. Van Tine, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 2003. mRNA splicing regulates human papillomavirus type 11 E1 protein production and DNA replication. *J Virol* **77**:10213-26.
 46. **Deng, W., B. Y. Lin, G. Jin, C. G. Wheeler, T. Ma, J. W. Harper, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 2004. Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J Virol* **78**:13954-65.
 47. **Desaintes, C., and C. Demeret.** 1996. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin Cancer Biol* **7**:339-47.
 48. **Desaintes, C., S. Goyat, S. Garbay, M. Yaniv, and F. Thierry.** 1999. Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells. *Oncogene* **18**:4538-45.
 49. **Dickson, M. A., W. C. Hahn, Y. Ino, V. Ronfard, J. Y. Wu, R. A. Weinberg, D. N. Louis, F. P. Li, and J. G. Rheinwald.** 2000. Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol* **20**:1436-47.
 50. **DiMaio, D., and D. Mattoon.** 2001. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* **20**:7866-73.
 51. **Dixon, E. P., G. L. Pahel, W. J. Rocque, J. A. Barnes, D. C. Lobe, M. H. Hanlon, K. A. Alexander, S. F. Chao, K. Lindley, and W. C. Phelps.** 2000. The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. *Virology* **270**:345-57.
 52. **Dong, G., T. R. Broker, and L. T. Chow.** 1994. Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J Virol* **68**:1115-27.
 53. **Doorbar, J., E. Medcalf, and S. Napthine.** 1996. Analysis of HPV1 E4 complexes and their association with keratins in vivo. *Virology* **218**:114-26.

54. **Doorbar, J., A. Parton, K. Hartley, L. Banks, T. Crook, M. Stanley, and L. Crawford.** 1990. Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology* **178**:254-62.
55. **Dostatni, N., P. F. Lambert, R. Sousa, J. Ham, P. M. Howley, and M. Yaniv.** 1991. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev* **5**:1657-71.
56. **Dunne, E. F., and L. E. Markowitz.** 2006. Genital human papillomavirus infection. *Clin Infect Dis* **43**:624-9.
57. **Dunne, E. F., E. R. Unger, M. Sternberg, G. McQuillan, D. C. Swan, S. S. Patel, and L. E. Markowitz.** 2007. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *Jama* **297**:813-9.
58. **Dyson, N., P. M. Howley, K. Munger, and E. Harlow.** 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**:934-7.
59. **Dziembowski, A., and B. Seraphin.** 2004. Recent developments in the analysis of protein complexes. *FEBS Lett* **556**:1-6.
60. **Edwards, A. M., B. Kus, R. Jansen, D. Greenbaum, J. Greenblatt, and M. Gerstein.** 2002. Bridging structural biology and genomics: assessing protein interaction data with known complexes. *Trends Genet* **18**:529-36.
61. **Enemark, E. J., G. Chen, D. E. Vaughn, A. Stenlund, and L. Joshua-Tor.** 2000. Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation protein E1 from papillomavirus. *Mol Cell* **6**:149-58.
62. **Enemark, E. J., and L. Joshua-Tor.** 2006. Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature* **442**:270-5.
63. **Enemark, E. J., A. Stenlund, and L. Joshua-Tor.** 2002. Crystal structures of two intermediates in the assembly of the papillomavirus replication initiation complex. *Embo J* **21**:1487-96.
64. **Fang, J., E. Acheampong, R. Dave, F. Wang, M. Mukhtar, and R. J. Pomerantz.** 2005. The RNA helicase DDX1 is involved in restricted HIV-1 Rev function in human astrocytes. *Virology* **336**:299-307.
65. **Fang, J., S. Kubota, B. Yang, N. Zhou, H. Zhang, R. Godbout, and R. J. Pomerantz.** 2004. A DEAD box protein facilitates HIV-1 replication as a cellular co-factor of Rev. *Virology* **330**:471-80.
66. **Fay, A., W. H. t. Yutzy, R. B. Roden, and J. Moroianu.** 2004. The positively charged termini of L2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and DNA binding. *J Virol* **78**:13447-54.
67. **Fehrmann, F., D. J. Klumpp, and L. A. Laimins.** 2003. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol* **77**:2819-31.

68. **Fenn, J. B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse.** 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**:64-71.
69. **Ferran, M. C., and A. A. McBride.** 1998. Transient viral DNA replication and repression of viral transcription are supported by the C-terminal domain of the bovine papillomavirus type 1 E1 protein. *J Virol* **72**:796-801.
70. **Florin, L., K. A. Becker, C. Lambert, T. Nowak, C. Sapp, D. Strand, R. E. Streeck, and M. Sapp.** 2006. Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein l2. *J Virol* **80**:6691-6.
71. **Florin, L., C. Sapp, R. E. Streeck, and M. Sapp.** 2002. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol* **76**:10009-14.
72. **Florin, L., F. Schafer, K. Sotlar, R. E. Streeck, and M. Sapp.** 2002. Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein l2. *Virology* **295**:97-107.
73. **Fouts, E. T., X. Yu, E. H. Egelman, and M. R. Botchan.** 1999. Biochemical and electron microscopic image analysis of the hexameric E1 helicase. *J Biol Chem* **274**:4447-58.
74. **Fradet-Turcotte A. and Archambault, J.** 2007. Recent Advances in the Search for Antiviral Agents Against Human Papillomaviruses. accepted in *Antiviral Therapy*.
75. **Franco, E. L., L. L. Villa, J. P. Sobrinho, J. M. Prado, M. C. Rousseau, M. Desy, and T. E. Rohan.** 1999. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* **180**:1415-23.
76. **Frattoni, M. G., and L. A. Laimins.** 1994. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* **204**:799-804.
77. **Fu, H.** 2004. Protein-Protein Interactions : Methods and Applications. *In* J. M. Walker (ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 261. Humana Press, New Jersey.
78. **Funk, J. O., S. Waga, J. B. Harry, E. Espling, B. Stillman, and D. A. Galloway.** 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* **11**:2090-100.
79. **Furth, P. A., W. T. Choe, J. H. Rex, J. C. Byrne, and C. C. Baker.** 1994. Sequences homologous to 5' splice sites are required for the inhibitory activity of papillomavirus late 3' untranslated regions. *Mol Cell Biol* **14**:5278-89.
80. **Gardioli, D., C. Kuhne, B. Glaunsinger, S. S. Lee, R. Javier, and L. Banks.** 1999. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* **18**:5487-96.
81. **Garret R.H., and C. M. Grisham.** 2000. *Biochimie*, 2 ed. DeBoeck Université, Paris.

82. **Gartner, L. P., and J.L. Hiatt.** 1992. Atlas d'histologie. De Boeck, Belgique.
83. **Gavin, A. C., M. Bosche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, J. Schultz, J. M. Rick, A. M. Michon, C. M. Cruciat, M. Remor, C. Hofert, M. Schelder, M. Brajenovic, H. Ruffner, A. Merino, K. Klein, M. Hudak, D. Dickson, T. Rudi, V. Gnau, A. Bauch, S. Bastuck, B. Huhse, C. Leutwein, M. A. Heurtier, R. R. Copley, A. Edelmann, E. Querfurth, V. Rybin, G. Drewes, M. Raida, T. Bouwmeester, P. Bork, B. Seraphin, B. Kuster, G. Neubauer, and G. Superti-Furga.** 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**:141-7.
84. **Giroglou, T., L. Florin, F. Schafer, R. E. Streeck, and M. Sapp.** 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* **75**:1565-70.
85. **Gloss, B., H. U. Bernard, K. Seedorf, and G. Klock.** 1987. The upstream regulatory region of the human papilloma virus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *Embo J* **6**:3735-43.
86. **Gonzalez, S. L., M. Stremlau, X. He, J. R. Basile, and K. Munger.** 2001. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol* **75**:7583-91.
87. **Hadaschik, D., K. Hinterkeuser, M. Oldak, H. J. Pfister, and S. Smola-Hess.** 2003. The Papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation. *J Virol* **77**:5253-65.
88. **Halbert, C. L., G. W. Demers, and D. A. Galloway.** 1991. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol* **65**:473-8.
89. **Han, Y., Y. M. Loo, K. T. Militello, and T. Melendy.** 1999. Interactions of the papovavirus DNA replication initiator proteins, bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen, with human replication protein A. *J Virol* **73**:4899-907.
90. **Hanson, P. I., and S. W. Whiteheart.** 2005. AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:519-29.
91. **Hawley-Nelson, P., K. H. Vousden, N. L. Hubbert, D. R. Lowy, and J. T. Schiller.** 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *Embo J* **8**:3905-10.
92. **Hernandez, H., A. Dziembowski, T. Taverner, B. Seraphin, and C. V. Robinson.** 2006. Subunit architecture of multimeric complexes isolated directly from cells. *EMBO Rep* **7**:605-10.
93. **Hickman, A. B., and F. Dyda.** 2005. Binding and unwinding: SF3 viral helicases. *Curr Opin Struct Biol* **15**:77-85.

94. **Hoffmann, R., B. Hirt, V. Bechtold, P. Beard, and K. Raj.** 2006. Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *J Virol* **80**:4431-9.
95. **Holmgren, S. C., N. A. Patterson, M. A. Ozbun, and P. F. Lambert.** 2005. The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle. *J Virol* **79**:3938-48.
96. **Hoppe-Seyler, F., K. Butz, and H. zur Hausen.** 1991. Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1. *J Virol* **65**:5613-8.
97. **Hou, S. Y., S. Y. Wu, T. Zhou, M. C. Thomas, and C. M. Chiang.** 2000. Alleviation of human papillomavirus E2-mediated transcriptional repression via formation of a TATA binding protein (or TFIID)-TFIIB-RNA polymerase II-TFIIF preinitiation complex. *Mol Cell Biol* **20**:113-25.
98. **Hsu, C. Y., F. Mechali, and C. Bonne-Andrea.** 2007. Nucleocytoplasmic shuttling of bovine papillomavirus E1 helicase downregulates viral DNA replication in S phase. *J Virol* **81**:384-94.
99. **Hu, Y., R. V. Clower, and T. Melendy.** 2006. Cellular topoisomerase I modulates origin binding by bovine papillomavirus type 1 E1. *J Virol* **80**:4363-71.
100. **Hubbert, N. L., J. T. Schiller, D. R. Lowy, and E. J. Androphy.** 1988. Bovine papilloma virus-transformed cells contain multiple E2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:5864-8.
101. **Hubbert, N. L., S. A. Sedman, and J. T. Schiller.** 1992. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J Virol* **66**:6237-41.
102. **Hubert, W. G., T. Kanaya, and L. A. Laimins.** 1999. DNA replication of human papillomavirus type 31 is modulated by elements of the upstream regulatory region that lie 5' of the minimal origin. *J Virol* **73**:1835-45.
103. **Huibregtse, J. M., M. Scheffner, and P. M. Howley.** 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *Embo J* **10**:4129-35.
104. **Huibregtse, J. M., M. Scheffner, and P. M. Howley.** 1993. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol* **13**:4918-27.
105. **Hummel, M., J. B. Hudson, and L. A. Laimins.** 1992. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol* **66**:6070-80.
106. **Hwang, E. S., T. Nottoli, and D. Dimaio.** 1995. The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology* **211**:227-33.
107. **Hwang, S. G., D. Lee, J. Kim, T. Seo, and J. Choe.** 2002. Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven

- transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *J Biol Chem* **277**:2923-30.
108. **Ilves, I., S. Kivi, and M. Ustav.** 1999. Long-term episomal maintenance of bovine papillomavirus type 1 plasmids is determined by attachment to host chromosomes, which is mediated by the viral E2 protein and its binding sites. *J Virol* **73**:4404-12.
 109. **Jiang, X., V. Klimovich, A. I. Arunkumar, E. B. Hysinger, Y. Wang, R. D. Ott, G. D. Guler, B. Weiner, W. J. Chazin, and E. Fanning.** 2006. Structural mechanism of RPA loading on DNA during activation of a simple pre-replication complex. *Embo J* **25**:5516-26.
 110. **Johnson, A., and M. O'Donnell.** 2005. Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu Rev Biochem* **74**:283-315.
 111. **Jones, D. L., R. M. Alani, and K. Munger.** 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* **11**:2101-11.
 112. **Joyce, J. G., J. S. Tung, C. T. Przysiecki, J. C. Cook, E. D. Lehman, J. A. Sands, K. U. Jansen, and P. M. Keller.** 1999. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* **274**:5810-22.
 113. **Kamper, N., P. M. Day, T. Nowak, H. C. Selinka, L. Florin, J. Bolscher, L. Hilbig, J. T. Schiller, and M. Sapp.** 2006. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol* **80**:759-68.
 114. **Karas, M., and F. Hillenkamp.** 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **60**:2299-301.
 115. **Kemmeren, P., N. L. van Berkum, J. Vilo, T. Bijma, R. Donders, A. Brazma, and F. C. Holstege.** 2002. Protein interaction verification and functional annotation by integrated analysis of genome-scale data. *Mol Cell* **9**:1133-43.
 116. **Kennedy, I. M., J. K. Haddow, and J. B. Clements.** 1990. Analysis of human papillomavirus type 16 late mRNA 3' processing signals in vitro and in vivo. *J Virol* **64**:1825-9.
 117. **Kim, K., P. A. Garner-Hamrick, C. Fisher, D. Lee, and P. F. Lambert.** 2003. Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol* **77**:12450-9.
 118. **Kiyono, T., S. A. Foster, J. I. Koop, J. K. McDougall, D. A. Galloway, and A. J. Klingelhutz.** 1998. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* **396**:84-8.
 119. **Kiyono, T., A. Hiraiwa, M. Fujita, Y. Hayashi, T. Akiyama, and M. Ishibashi.** 1997. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins

- to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:11612-6.
120. **Klingelhutz, A. J., S. A. Foster, and J. K. McDougall.** 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* **380**:79-82.
 121. **Klumpp, D. J., and L. A. Laimins.** 1999. Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology* **257**:239-46.
 122. **Koonin, E. V.** 1993. A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Nucleic Acids Res* **21**:2541-7.
 123. **Kovelman, R., G. K. Bilter, E. Glezer, A. Y. Tsou, and M. S. Barbosa.** 1996. Enhanced transcriptional activation by E2 proteins from the oncogenic human papillomaviruses. *J Virol* **70**:7549-60.
 124. **Krude, T.** 2006. Initiation of chromosomal DNA replication in mammalian cell-free systems. *Cell Cycle* **5**:2115-22.
 125. **Kumar, A., G. Meinke, D. K. Reese, S. Moine, P. J. Phelan, A. F. Turcotte, J. Archambault, A. Bohm, and P. A. Bullock.** 2007. A model for T-antigen dependent melting of the Simian Virus 40 Core Origin based on studies of the interaction of the beta-hairpin with DNA. *J Virol*.
 126. **Kuo, S. R., J. S. Liu, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 1994. Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *J Biol Chem* **269**:24058-65.
 127. **Lambert, P. F., B. A. Spalholz, and P. M. Howley.** 1987. A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator. *Cell* **50**:69-78.
 128. **LaPorta, R. F., and L. B. Taichman.** 1982. Human papilloma viral DNA replicates as a stable episome in cultured epidermal keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**:3393-7.
 129. **Lee, D., H. Sohn, G. V. Kalpana, and J. Choe.** 1999. Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature* **399**:487-91.
 130. **Lee, S. S., B. Glaunsinger, F. Mantovani, L. Banks, and R. T. Javier.** 2000. Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J Virol* **74**:9680-93.
 131. **Lee, S. S., R. S. Weiss, and R. T. Javier.** 1997. Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:6670-5.
 132. **Lentz, M. R., S. M. Stevens, Jr., J. Raynes, and N. Elkhoury.** 2006. A phosphorylation map of the bovine papillomavirus E1 helicase. *Virol J* **3**:13.

133. **Li, D., and R. Roberts.** 2001. WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci* **58**:2085-97.
134. **Lin, B. Y., T. Ma, J. S. Liu, S. R. Kuo, G. Jin, T. R. Broker, J. W. Harper, and L. T. Chow.** 2000. HeLa cells are phenotypically limiting in cyclin E/CDK2 for efficient human papillomavirus DNA replication. *J Biol Chem* **275**:6167-74.
135. **Lin, B. Y., A. M. Makhov, J. D. Griffith, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 2002. Chaperone proteins abrogate inhibition of the human papillomavirus (HPV) E1 replicative helicase by the HPV E2 protein. *Mol Cell Biol* **22**:6592-604.
136. **Liu, J. S., S. R. Kuo, A. M. Makhov, D. M. Cyr, J. D. Griffith, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 1998. Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. *J Biol Chem* **273**:30704-12.
137. **Liu, Y., J. J. Chen, Q. Gao, S. Dalal, Y. Hong, C. P. Mansur, V. Band, and E. J. Androphy.** 1999. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *J Virol* **73**:7297-307.
138. **Lodowski, D. T., J. A. Pitcher, W. D. Capel, R. J. Lefkowitz, and J. J. Tesmer.** 2003. Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma. *Science* **300**:1256-62.
139. **Longworth, M. S., and L. A. Laimins.** 2004. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* **78**:3533-41.
140. **Longworth, M. S., and L. A. Laimins.** 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:362-72.
141. **Longworth, M. S., R. Wilson, and L. A. Laimins.** 2005. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *Embo J* **24**:1821-30.
142. **Loo, Y. M., and T. Melendy.** 2004. Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol* **78**:1605-15.
143. **Lusky, M., J. Hurwitz, and Y. S. Seo.** 1993. Cooperative assembly of the bovine papilloma virus E1 and E2 proteins on the replication origin requires an intact E2 binding site. *J Biol Chem* **268**:15795-803.
144. **Ma, T., N. Zou, B. Y. Lin, L. T. Chow, and J. W. Harper.** 1999. Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:382-7.

145. **Malcles, M. H., N. Cueille, F. Mechali, O. Coux, and C. Bonne-Andrea.** 2002. Regulation of bovine papillomavirus replicative helicase e1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Virol* **76**:11350-8.
146. **Mann, M., R. C. Hendrickson, and A. Pandey.** 2001. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* **70**:437-73.
147. **Marchetti, B., G. H. Ashrafi, E. S. Dornan, E. H. Araibi, S. A. Ellis, and M. S. Campo.** 2006. The E5 protein of BPV-4 interacts with the heavy chain of MHC class I and irreversibly retains the MHC complex in the Golgi apparatus. *Oncogene* **25**:2254-63.
148. **Masterson, P. J., M. A. Stanley, A. P. Lewis, and M. A. Romanos.** 1998. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol* **72**:7407-19.
149. **McIntyre, M. C., M. N. Ruesch, and L. A. Laimins.** 1996. Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology* **215**:73-82.
150. **McPhillips, M. G., J. G. Oliveira, J. E. Spindler, R. Mitra, and A. A. McBride.** 2006. Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *J Virol* **80**:9530-43.
151. **McShan, G. D., and V. G. Wilson.** 1997. Casein kinase II phosphorylates bovine papillomavirus type 1 E1 in vitro at a conserved motif. *J Gen Virol* **78** (Pt 1):171-7.
152. **Mechali, F., C. Y. Hsu, A. Castro, T. Lorca, and C. Bonne-Andrea.** 2004. Bovine papillomavirus replicative helicase E1 is a target of the ubiquitin ligase APC. *J Virol* **78**:2615-9.
153. **Melendy, T., J. Sedman, and A. Stenlund.** 1995. Cellular factors required for papillomavirus DNA replication. *J Virol* **69**:7857-67.
154. **Middleton, K., W. Peh, S. Southern, H. Griffin, K. Sotlar, T. Nakahara, A. El-Sherif, L. Morris, R. Seth, M. Hibma, D. Jenkins, P. Lambert, N. Coleman, and J. Doorbar.** 2003. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol* **77**:10186-201.
155. **Mohr, I. J., R. Clark, S. Sun, E. J. Androphy, P. MacPherson, and M. R. Botchan.** 1990. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* **250**:1694-9.
156. **Mondor, I., S. Ugolini, and Q. J. Sattentau.** 1998. Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J Virol* **72**:3623-34.
157. **Moody, C., A. Fradet-Turcotte, J. Archambault, and L. A. Laimins.** 2007. Human papillomaviruses activate caspases upon epithelial differentiation to promote genome amplification through cleavage of the E1 replication protein. *Genes and Development*. Submitted paper.

158. **Muller, A., A. Ritzkowski, and G. Steger.** 2002. Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular coactivator p300. *J Virol* **76**:11042-53.
159. **Mungal, S., B. M. Steinberg, and L. B. Taichman.** 1992. Replication of plasmid-derived human papillomavirus type 11 DNA in cultured keratinocytes. *J Virol* **66**:3220-4.
160. **Munger, K., A. Baldwin, K. M. Edwards, H. Hayakawa, C. L. Nguyen, M. Owens, M. Grace, and K. Huh.** 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* **78**:11451-60.
161. **Munger, K., W. C. Phelps, V. Bubbs, P. M. Howley, and R. Schlegel.** 1989. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* **63**:4417-21.
162. **Munoz, N.** 2000. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* **19**:1-5.
163. **Nakagawa, S., and J. M. Huibregtse.** 2000. Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol* **20**:8244-53.
164. **Narahari, J., J. C. Fisk, T. Melendy, and A. Roman.** 2006. Interactions of the cellular CCAAT displacement protein and human papillomavirus E2 protein with the viral origin of replication can regulate DNA replication. *Virology* **350**:302-11.
165. **Nasseri, M., R. Hirochika, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 1987. A human papilloma virus type 11 transcript encoding an E1--E4 protein. *Virology* **159**:433-9.
166. **Nelson, L. M., R. C. Rose, and J. Moroianu.** 2002. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem* **277**:23958-64.
167. **Neuwald, A. F., L. Aravind, J. L. Spouge, and E. V. Koonin.** 1999. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* **9**:27-43.
168. **Nguyen, M. L., M. M. Nguyen, D. Lee, A. E. Griep, and P. F. Lambert.** 2003. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J Virol* **77**:6957-64.
169. **Nishitani, H., and Z. Lygerou.** 2002. Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes Cells* **7**:523-34.
170. **No, D., T. P. Yao, and R. M. Evans.** 1996. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:3346-51.
171. **O'Connor, M. J., W. Stunkel, C. H. Koh, H. Zimmermann, and H. U. Bernard.** 2000. The differentiation-specific factor CDP/Cut represses

- transcription and replication of human papillomaviruses through a conserved silencing element. *J Virol* **74**:401-10.
172. **Oberg, D., J. Fay, H. Lambkin, and S. Schwartz.** 2005. A downstream polyadenylation element in human papillomavirus type 16 L2 encodes multiple GGG motifs and interacts with hnRNP H. *J Virol* **79**:9254-69.
 173. **Offord, E. A., and P. Beard.** 1990. A member of the activator protein 1 family found in keratinocytes but not in fibroblasts required for transcription from a human papillomavirus type 18 promoter. *J Virol* **64**:4792-8.
 174. **Oh, S. T., M. S. Longworth, and L. A. Laimins.** 2004. Roles of the E6 and E7 proteins in the life cycle of low-risk human papillomavirus type 11. *J Virol* **78**:2620-6.
 175. **Okun, M. M., P. M. Day, H. L. Greenstone, F. P. Booy, D. R. Lowy, J. T. Schiller, and R. B. Roden.** 2001. L1 interaction domains of papillomavirus L2 necessary for viral genome encapsidation. *J Virol* **75**:4332-42.
 176. **Ozbun, M. A., and C. Meyers.** 1997. Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol* **71**:5161-72.
 177. **Ozbun, M. A., and C. Meyers.** 1998. Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology* **248**:218-30.
 178. **Ozbun, M. A., and C. Meyers.** 1998. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J Virol* **72**:2715-22.
 179. **Park, J., B. S. Lee, J. K. Choi, R. E. Means, J. Choe, and J. U. Jung.** 2002. Herpesviral protein targets a cellular WD repeat endosomal protein to downregulate T lymphocyte receptor expression. *Immunity* **17**:221-33.
 180. **Peh, W. L., K. Middleton, N. Christensen, P. Nicholls, K. Egawa, K. Sotlar, J. Brandsma, A. Percival, J. Lewis, W. J. Liu, and J. Doorbar.** 2002. Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. *J Virol* **76**:10401-16.
 181. **Peters, J. M.** 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* **9**:931-43.
 182. **Puig, O., F. Caspary, G. Rigaut, B. Rutz, E. Bouveret, E. Bragado-Nilsson, M. Wilm, and B. Seraphin.** 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**:218-29.
 183. **Raney, K. D.** 2006. A helicase staircase. *Nat Struct Mol Biol* **13**:671-2.
 184. **Rangasamy, D., and V. G. Wilson.** 2000. Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell Ubc9 protein. *J Biol Chem* **275**:30487-95.
 185. **Rangasamy, D., K. Woytek, S. A. Khan, and V. G. Wilson.** 2000. SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation. *J Biol Chem* **275**:37999-8004.

186. **Remm, M., R. Brain, and J. R. Jenkins.** 1992. The E2 binding sites determine the efficiency of replication for the origin of human papillomavirus type 18. *Nucleic Acids Res* **20**:6015-21.
187. **Remy, I., and Michnick S.W.** 2004. Mapping Biochemical Networks with Protein-Fragment Complementation Assays, p. 411-426. *In* H. Fu (ed.), *Protein-Protein Interactions : Methods and Applications*, vol. 261. Humana Press, New Jersey.
188. **Remy, I., and S. W. Michnick.** 1999. Clonal selection and in vivo quantitation of protein interactions with protein-fragment complementation assays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:5394-9.
189. **Richards, R. M., D. R. Lowy, J. T. Schiller, and P. M. Day.** 2006. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:1522-7.
190. **Riley, R. R., S. Duensing, T. Brake, K. Munger, P. F. Lambert, and J. M. Arbeit.** 2003. Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res* **63**:4862-71.
191. **Roberts, S., I. Ashmole, S. M. Rookes, and P. H. Gallimore.** 1997. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1--E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol* **71**:3554-62.
192. **Rosl, F., A. Arab, B. Klevenz, and H. zur Hausen.** 1993. The effect of DNA methylation on gene regulation of human papillomaviruses. *J Gen Virol* **74** (Pt 5):791-801.
193. **Rost, B., P. Fariselli, and R. Casadio.** 1996. Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci* **5**:1704-18.
194. **Rost, B., and C. Sander.** 1993. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol* **232**:584-99.
195. **Rotenberg, M. O., C. M. Chiang, M. L. Ho, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 1989. Characterization of cDNAs of spliced HPV-11 E2 mRNA and other HPV mRNAs recovered via retrovirus-mediated gene transfer. *Virology* **172**:468-77.
196. **Ruesch, M. N., F. Stubenrauch, and L. A. Laimins.** 1998. Activation of papillomavirus late gene transcription and genome amplification upon differentiation in semisolid medium is coincident with expression of involucrin and transglutaminase but not keratin-10. *J Virol* **72**:5016-24.
197. **Sanders, C. M., and A. Stenlund.** 1998. Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor. *Embo J* **17**:7044-55.
198. **Sanders, C. M., and A. Stenlund.** 2000. Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. *J Biol Chem* **275**:3522-34.

199. **Schuck, S., and A. Stenlund.** 2005. Assembly of a double hexameric helicase. *Mol Cell* **20**:377-89.
200. **Schuck, S., and A. Stenlund.** 2006. Surface mutagenesis of the bovine papillomavirus E1 DNA binding domain reveals residues required for multiple functions related to DNA replication. *J Virol* **80**:7491-9.
201. **Schweiger, M. R., J. You, and P. M. Howley.** 2006. Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function. *J Virol* **80**:4276-85.
202. **Sedman, J., and A. Stenlund.** 1995. Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro. *Embo J* **14**:6218-28.
203. **Sedman, J., and A. Stenlund.** 1998. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J Virol* **72**:6893-7.
204. **Selinka, H. C., T. Giroglou, and M. Sapp.** 2002. Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology* **299**:279-287.
205. **Senechal, H., G. G. Poirier, B. Coulombe, L. A. Laimins, and J. Archambault.** 2007. Amino acid substitutions that specifically impair the transcriptional activity of papillomavirus E2 affect binding to the long isoform of Brd4. *Virology* **358**:10-7.
206. **Seo, Y. S., F. Muller, M. Lusky, and J. Hurwitz.** 1993. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:702-6.
207. **Sivaprasad, U., Y. J. Machida, and A. Dutta.** 2007. APC/C - the master controller of origin licensing? *Cell Div* **2**:8.
208. **Sobott, F., and C. V. Robinson.** 2002. Protein complexes gain momentum. *Curr Opin Struct Biol* **12**:729-34.
209. **Soeda, E., M. C. Ferran, C. C. Baker, and A. A. McBride.** 2006. Repression of HPV16 early region transcription by the E2 protein. *Virology* **351**:29-41.
210. **Spink, K. M., and L. A. Laimins.** 2005. Induction of the human papillomavirus type 31 late promoter requires differentiation but not DNA amplification. *J Virol* **79**:4918-26.
211. **Stagljar, I., C. Korostensky, N. Johnsson, and S. te Heesen.** 1998. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:5187-92.
212. **Stanley, M. A., H. M. Browne, M. Appleby, and A. C. Minson.** 1989. Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line. *Int J Cancer* **43**:672-6.

213. **Steger, G., and S. Corbach.** 1997. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol* **71**:50-8.
214. **Steger, G., C. Schnabel, and H. M. Schmidt.** 2002. The hinge region of the human papillomavirus type 8 E2 protein activates the human p21(WAF1/CIP1) promoter via interaction with Sp1. *J Gen Virol* **83**:503-10.
215. **Steinberg, T. H., R. P. Haugland, and V. L. Singer.** 1996. Applications of SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains. *Anal Biochem* **239**:238-45.
216. **Steinberg, T. H., L. J. Jones, R. P. Haugland, and V. L. Singer.** 1996. SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Anal Biochem* **239**:223-37.
217. **Stenlund, A.** 2003. E1 initiator DNA binding specificity is unmasked by selective inhibition of non-specific DNA binding. *Embo J* **22**:954-63.
218. **Straight, S. W., B. Herman, and D. J. McCance.** 1995. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol* **69**:3185-92.
219. **Straight, S. W., P. M. Hinkle, R. J. Jewers, and D. J. McCance.** 1993. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol* **67**:4521-32.
220. **Stubenrauch, F., M. Hummel, T. Iftner, and L. A. Laimins.** 2000. The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *J Virol* **74**:1178-86.
221. **Stubenrauch, F., T. Zobel, and T. Iftner.** 2001. The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J Virol* **75**:4139-49.
222. **Sun, X. Y., I. Frazer, M. Muller, L. Gissmann, and J. Zhou.** 1995. Sequences required for the nuclear targeting and accumulation of human papillomavirus type 6B L2 protein. *Virology* **213**:321-7.
223. **Sun, Y., H. Han, and D. J. McCance.** 1998. Active domains of human papillomavirus type 11 E1 protein for origin replication. *J Gen Virol* **79** (Pt 7):1651-8.
224. **Sunden, Y., S. Semba, T. Suzuki, Y. Okada, Y. Orba, K. Nagashima, T. Umemura, and H. Sawa.** 2007. DDX1 Promotes Proliferation of the JC Virus through Transactivation of Its Promoter. *Microbiol Immunol* **51**:339-47.
225. **Swindle, C. S., and J. A. Engler.** 1998. Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1. *J Virol* **72**:1994-2001.
226. **Swindle, C. S., N. Zou, B. A. Van Tine, G. M. Shaw, J. A. Engler, and L. T. Chow.** 1999. Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *J Virol* **73**:1001-9.

227. **Tan, S. H., B. Gloss, and H. U. Bernard.** 1992. During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res* **20**:251-6.
228. **Terhune, S. S., W. G. Hubert, J. T. Thomas, and L. A. Laimins.** 2001. Early polyadenylation signals of human papillomavirus type 31 negatively regulate capsid gene expression. *J Virol* **75**:8147-57.
229. **Terhune, S. S., C. Milcarek, and L. A. Laimins.** 1999. Regulation of human papillomavirus type 31 polyadenylation during the differentiation-dependent life cycle. *J Virol* **73**:7185-92.
230. **Thomas, J. T., W. G. Hubert, M. N. Ruesch, and L. A. Laimins.** 1999. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:8449-54.
231. **Thomas, M., and L. Banks.** 1999. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol* **80 (Pt 6)**:1513-7.
232. **Thomas, M., and L. Banks.** 1998. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* **17**:2943-54.
233. **Thomas, M., R. Laura, K. Hepner, E. Guccione, C. Sawyers, L. Lasky, and L. Banks.** 2002. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene* **21**:5088-96.
234. **Thomsen, P., B. van Deurs, B. Norrild, and L. Kayser.** 2000. The HPV16 E5 oncogene inhibits endocytic trafficking. *Oncogene* **19**:6023-32.
235. **Titolo, S., K. Brault, J. Majewski, P. W. White, and J. Archambault.** 2003. Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus e1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein. *J Virol* **77**:5178-91.
236. **Titolo, S., A. Pelletier, A. M. Pulichino, K. Brault, E. Wardrop, P. W. White, M. G. Cordingley, and J. Archambault.** 2000. Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin. *J Virol* **74**:7349-61.
237. **Titolo, S., A. Pelletier, F. Sauve, K. Brault, E. Wardrop, P. W. White, A. Amin, M. G. Cordingley, and J. Archambault.** 1999. Role of the ATP-binding domain of the human papillomavirus type 11 E1 helicase in E2-dependent binding to the origin. *J Virol* **73**:5282-93.
238. **Tommasino, M., J. P. Adamczewski, F. Carlotti, C. F. Barth, R. Manetti, M. Contorni, F. Cavalieri, T. Hunt, and L. Crawford.** 1993. HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene* **8**:195-202.
239. **Trybala, E., B. Svennerholm, T. Bergstrom, S. Olofsson, S. Jeansson, and J. L. Goodman.** 1993. Herpes simplex virus type 1-induced

- hemagglutination: glycoprotein C mediates virus binding to erythrocyte surface heparan sulfate. *J Virol* **67**:1278-85.
240. **Tuteja, N., and R. Tuteja.** 2004. Unraveling DNA helicases. Motif, structure, mechanism and function. *Eur J Biochem* **271**:1849-63.
 241. **Van Tine, B. A., L. D. Dao, S. Y. Wu, T. M. Sonbuchner, B. Y. Lin, N. Zou, C. M. Chiang, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 2004. Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:4030-5.
 242. **Varshavsky, A.** 1996. The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:12142-9.
 243. **Veldman, T., X. Liu, H. Yuan, and R. Schlegel.** 2003. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:8211-6.
 244. **Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer, and N. Munoz.** 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**:12-9.
 245. **Wang, J., A. Sampath, P. Raychaudhuri, and S. Bagchi.** 2001. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene* **20**:4740-9.
 246. **Wang, Q., H. Griffin, S. Southern, D. Jackson, A. Martin, P. McIntosh, C. Davy, P. J. Masterson, P. A. Walker, P. Laskey, M. B. Omary, and J. Doorbar.** 2004. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1=E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *J Virol* **78**:821-33.
 247. **Webster, K., J. Parish, M. Pandya, P. L. Stern, A. R. Clarke, and K. Gaston.** 2000. The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem* **275**:87-94.
 248. **Welter, J. F., and R. L. Eckert.** 1995. Differential expression of the fos and jun family members c-fos, fosB, Fra-1, Fra-2, c-jun, junB and junD during human epidermal keratinocyte differentiation. *Oncogene* **11**:2681-7.
 249. **Werness, B. A., A. J. Levine, and P. M. Howley.** 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**:76-9.
 250. **White, P. W., A. Pelletier, K. Brault, S. Titolo, E. Welchner, L. Thauvette, M. Fazekas, M. G. Cordingley, and J. Archambault.** 2001. Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain. *J Biol Chem* **276**:22426-38.

- 251. **Wilson, R., F. Fehrmann, and L. A. Laimins.** 2005. Role of the E1--E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* **79**:6732-40.
- 252. **Wilson, R., G. B. Ryan, G. L. Knight, L. A. Laimins, and S. Roberts.** 2007. The full-length E1;E4 protein of human papillomavirus type 18 modulates differentiation-dependent viral DNA amplification and late gene expression. *Virology*.
- 253. **Wilson, V. G., M. West, K. Woytek, and D. Rangasamy.** 2002. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes* **24**:275-90.
- 254. **Wu, S. Y., A. Y. Lee, S. Y. Hou, J. K. Kemper, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and C. M. Chiang.** 2006. Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing. *Genes Dev* **20**:2383-96.
- 255. **Yang, L., and M. Botchan.** 1990. Replication of bovine papillomavirus type 1 DNA initiates within an E2-responsive enhancer element. *J Virol* **64**:5903-11.
- 256. **Yang, L., R. Li, I. J. Mohr, R. Clark, and M. R. Botchan.** 1991. Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. *Nature* **353**:628-32.
- 257. **Yasugi, T., M. Vidal, H. Sakai, P. M. Howley, and J. D. Benson.** 1997. Two classes of human papillomavirus type 16 E1 mutants suggest pleiotropic conformational constraints affecting E1 multimerization, E2 interaction, and interaction with cellular proteins. *J Virol* **71**:5942-51.
- 258. **You, J., J. L. Croyle, A. Nishimura, K. Ozato, and P. M. Howley.** 2004. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* **117**:349-60.
- 259. **You, J., M. R. Schweiger, and P. M. Howley.** 2005. Inhibition of E2 binding to Brd4 enhances viral genome loss and phenotypic reversion of bovine papillomavirus-transformed cells. *J Virol* **79**:14956-61.
- 260. **Zanardi, T. A., C. M. Stanley, B. M. Saville, S. M. Spacek, and M. R. Lentz.** 1997. Modulation of bovine papillomavirus DNA replication by phosphorylation of the viral E1 protein. *Virology* **228**:1-10.
- 261. **Zerfass-Thome, K., W. Zwerschke, B. Mannhardt, R. Tindle, J. W. Botz, and P. Jansen-Durr.** 1996. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* **13**:2323-30.
- 262. **Zerfass, K., A. Schulze, D. Spitkovsky, V. Friedman, B. Henglein, and P. Jansen-Durr.** 1995. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol* **69**:6389-99.
- 263. **Zhao, K. N., W. Gu, N. X. Fang, N. A. Saunders, and I. H. Frazer.** 2005. Gene codon composition determines differentiation-dependent expression of a viral capsid gene in keratinocytes in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* **25**:8643-55.

- 264. **Zhao, K. N., W. J. Liu, and I. H. Frazer.** 2003. Codon usage bias and A+T content variation in human papillomavirus genomes. *Virus Res* **98**:95-104.
- 265. **Zheng, Z. M., and C. C. Baker.** 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* **11**:2286-302.
- 266. **Zheng, Z. M., M. Tao, K. Yamanegi, S. Bodaghi, and W. Xiao.** 2004. Splicing of a cap-proximal human Papillomavirus 16 E6E7 intron promotes E7 expression, but can be restrained by distance of the intron from its RNA 5' cap. *J Mol Biol* **337**:1091-108.
- 267. **Zhou, J., W. J. Liu, S. W. Peng, X. Y. Sun, and I. Frazer.** 1999. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. *J Virol* **73**:4972-82.
- 268. **Zhou, J., X. Y. Sun, K. Louis, and I. H. Frazer.** 1994. Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J Virol* **68**:619-25.
- 269. **Zimmermann, H., R. Degenkolbe, H. U. Bernard, and M. J. O'Connor.** 1999. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol* **73**:6209-19.
- 270. **Zou, N., B. Y. Lin, F. Duan, K. Y. Lee, G. Jin, R. Guan, G. Yao, E. J. Lefkowitz, T. R. Broker, and L. T. Chow.** 2000. The hinge of the human papillomavirus type 11 E2 protein contains major determinants for nuclear localization and nuclear matrix association. *J Virol* **74**:3761-70.
- 271. **zur Hausen, H.** 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* **92**:690-8.

ANNEXE 1

ID Macaque	-----MAAHHRQNTAGRRKVQVSY	19
ID Chimpanzé	MSSTVNSFSAFVLLGPLGEGAESASQGLGPHNDVGSTCKMAAHHRQNTAGRRKVQVSY	60
ID Humain	-----MAAHHRQNTAGRRKVQVSY	19
ID Bovin	-----MAAHHRQNTAGRRKVQVSY	19
ID Souris	-----MAAHHRQNTAGRRKVQVSY	19
ID Poulet	-----MAAHHRQNTAGRRKVQVSY	19
ID Poisson	-----MATLHRQNAAGRRKVQVSY	19
	:*:*****	
ID Macaque	VIRDEVEKYNNRNGVNALQLDPALNRLFTAGRDSIIRIWSVNQHKQDPYIASMEHHTDWN	79
ID Chimpanzé	VIRDEVEKYNNRNGVNALQLDPALNRLFTAGRDSIIRIWSVNQHKQDPYIASMEHHTDWN	120
ID Humain	VIRDEVEKYNNRNGVNALQLDPALNRLFTAGRDSIIRIWSVNQHKQDPYIASMEHHTDWN	79
ID Bovin	VIRDEVEKYNNRNGVNALQLDPALNRLFTAGRDSIIRIWSVNQHKQDPYIASMEHHTDWN	79
ID Souris	VIRDEVEKYNNRNGVNALQLDPALNRLFTAGRDSIIRIWSVNQHKQDPYIASMEHHTDWN	79
ID Poulet	VIRDEVEKYNNRNGVNALQLDPALNRLFTAGRDSIIRIWSVNQHKQDPYIASMEHHTDWN	79
ID Poisson	VIRDEVEKYNNRNGVNALQLDPALNRLFTAGRDSIIRIWSVNQHKQDPYIASMEHHTDWN	79

ID Macaque	DIVLCCNGKTLISASSDTTVKVWNAHKGFCMSTLRTHKDYVKALAYAKDKELVASAGLDR	139
ID Chimpanzé	DIVLCCNGKTLISASSDTTVKVWNAHKGFCMSTLRTHKDYVKALAYAKDKELVASAGLDR	180
ID Humain	DIVLCCNGKTLISASSDTTVKVWNAHKGFCMSTLRTHKDYVKALAYAKDKELVASAGLDR	139
ID Bovin	DIVLCCNGKTLISASSDTTVKVWNAHKGFCMSTLRTHKDYVKALAYAKDKELVASAGLDR	139
ID Souris	DIVLCCNGKTLISASSDTTVKVWNAHKGFCMSTLRTHKDYVKALAYAKDKELVASAGLDR	139
ID Poulet	DIVLCCNGKTLISASSDTTVKVWNAHKGFCMSTLRTHKDYVKALAYAKDKELVASAGLDR	139
ID Poisson	DIILCCNGKTLISASSDTTVKVWNAHKGFCMSTLRTHKDYVKALAYAKDKELVASAGLDR	139
	*.:*****	
ID Macaque	QIFLWDVNTLTALTASNNTVTSSLSGNKDSIYSLAMNQLGTIIIVSGSTEKVLRVWDPRT	199
ID Chimpanzé	QIFLWDVNTLTALTASNNTVTSSLSGNKDSIYSLAMNQLGTIIIVSGSTEKVLRVWDPRT	240
ID Humain	QIFLWDVNTLTALTASNNTVTSSLSGNKDSIYSLAMNQLGTIIIVSGSTEKVLRVWDPRT	199
ID Bovin	QIFLWDVNTLTALTASNNTVTSSLSGNKDSIYSLAMNQLGTIIIVSGSTEKVLRVWDPRT	199
ID Souris	QIFLWDVNTLTALTASNNTVTSSLSGNKDSIYSLAMNQLGTIIIVSGSTEKVLRVWDPRT	199
ID Poulet	QIFLWDVNTLTALTASNNTVTSSLSGNKDSIYSLAMNQLGTIIIVSGSTEKVLRVWDPRT	199
ID Poisson	QIFLWDVNTLTALTASNNTVTSSLSGNKDSIYSLAMNQLGTIIIVSGSTEKVLRVWDPRT	199
	***** *:*****	
ID Macaque	CAKLMKLKGHTDNVKALLNDRDGTQCLSGSSDGTIRLWSLGQQRCIATYRVHDEGVWALQ	259
ID Chimpanzé	CAKLMKLKGHTDNVKALLNDRDGTQCLSGSSDGTIRLWSLGQQRCIATYRVHDEGVWALQ	300
ID Humain	CAKLMKLKGHTDNVKALLNDRDGTQCLSGSSDGTIRLWSLGQQRCIATYRVHDEGVWALQ	259
ID Bovin	CAKLMKLKGHTDNVKALLNDRDGTQCLSGSSDGTIRLWSLGQQRCIATYRVHDEGVWALQ	259
ID Souris	CAKLMKLKGHTDNVKALLNDRDGTQCLSGSSDGTIRLWSLGQQRCIATYRVHDEGVWALQ	259
ID Poulet	CAKLMKLKGHTDNVKALLNDRDGTQCLSGSSDGTIRLWSLGQQRCIATYRVHDEGVWALQ	259
ID Poisson	CAKLMKLKGHTDNVKSLLNDRDGTQCLSGSSDGTIRLWSLGQQRCIATYRVHDEGVWALQ	259
	*****:****:*****	
ID Macaque	VNDAFTHVYSGGRDRKIYCTDLRNPDIRVLICEEKAPVLKMELDERSADPPPAIWVATTKS	319
ID Chimpanzé	VNDAFTHVYSGGRDRKIYCTDLRNPDIRVLICEEKAPVLKMELDERSADPPPAIWVATTKS	360
ID Humain	VNDAFTHVYSGGRDRKIYCTDLRNPDIRVLICEEKAPVLKMELDERSADPPPAIWVATTKS	319
ID Bovin	VNDAFTHVYSGGRDRKIYCTDLRNPDIRVLICEEKAPVLKMELDERSADPPPAIWVATTKS	319
ID Souris	VNDAFTHVYSGGRDRKIYCTDLRNPDIRVLICEEKAPVLKMELDERSADPPPAIWVATTKS	319
ID Poulet	VNEAFTHVYSGGRDRKIYCTDLRNPDIRVLICEEKAPVLKMELDERSADPPPAIWVATTKS	319
ID Poisson	VNEAFTHVYSGGRDRKIYCTDLRNPDMRVLICEEKAPVLKMELDERSADPPQSIWVSTTKS	319
	:*:*****:*****:*****:*****:*****	


```

ID|Macaque      TVNKWTLKGIHNFRASGDYDNDCTNPITPLCTQPDQVIKGGASIIQCHILNDRHILTKD 379
ID|Chimpanzé   TVNKWTLKGIHNFRASGDYDNDCTNPITPLCTQPDQVIKGGASIIQCHILNDRHILTKD 420
ID|Humain      TVNKWTLKGIHNFRASGDYDNDCTNPITPLCTQPDQVIKGGASIIQCHILNDRHILTKD 379
ID|Bovin       TVNKWTLKGIHNFRASGDYDNDCTNPITPLCTQPDQVIKGGASIIQCHILNDRHILTKD 379
ID|Souris      TVNKWTLKGIHNFRASGDYDNDCTNPITPLCTQPDQVIKGGASIIQCHILNDRHILTKD 379
ID|Poulet      SVNKWTLKGIHNFRASGDYDNDCTNPITPLCTQPDQVIKGGASIIQCHILNDRHILTKD 379
ID|Poisson     FVNKWSLKAMHNFRASGDYDNDCTPLTPLCTQPEQVIKGGTSIVQCHILNDRHILTKD 379
               **** *:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

ID|Macaque      TNNNVAYW----- 387
ID|Chimpanzé   TNNNVAYWDVLKACKVEDLGKVD FEDEIKKRFKMVYVPNWFSVDLKTGMLTITLDES DCF 480
ID|Humain      TNNNVAYWDVLKACKVEDLGKVD FEDEIKKRFKMVYVPNWFSVDLKTGMLTITLDES DCF 439
ID|Bovin       TNNNVAYWDVLKACKVEDLGKVD FEDEIKKRFKMVYVPNWFSVDLKTGMLTITLDES DCF 439
ID|Souris      TNNNVAYWDVLKACKVEDLGKVD FEDEIKKRFKM-----MLTITLDES DCF 425
ID|Poulet      TNNNVAYWDVLKACKVEDLGKVD FEDEIKKRFKMVYVPNWFSVDLKTGMLTITLDES DCF 439
ID|Poisson     TNSVAFWDVLKACKGEDLGKVD FEDEVKKRFBMVYVPNWFSVDLKTGMLTITLDES DCF 439
               ***.***.*

ID|Macaque      ---VSVKDAGFSSPDGSDPKNLNLGGLLLQALLEYWPRTHVNPMDDEEENEVNHVNGE-QEN 443
ID|Chimpanzé   AAWWSAKDAGFSSPDGSDPKNLNLGGLLLQALLEYWPRTHVNPMDDEEENEVNHVNGE-QEN 539
ID|Humain      AAWWSAKDAGFSSPDGSDPKNLNLGGLLLQALLEYWPRTHVNPMDDEEENEVNHVNGE-QEN 498
ID|Bovin       AAWWSAKDAGFSSPDGSDPKNLNLGGLLLQALLEYWPRTHVNPMDDEEENEVNHVNGE-QEN 498
ID|Souris      AAWWSAKDAGFSSPDGSDPKNLNLGGLLLQALLEYWPRTHVTPMDDEEENEVNHVSGG-QES 484
ID|Poulet      AAWWSAKDAGFSSPDGSDPKNLNLGGLLLQALLEYWPRTHINPMDDEEENEINHAVNGEQEN 499
ID|Poisson     AAWVAAKDAGFTSPDGSDPKNLNLGGLLLQALLEFWPRTHINPMDDEEENEINHAVNGE-QES 498
               *:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

ID|Macaque      RVQKNGYFQVPPHTPVI FGEAGGRTLFRLLCRDSGGETESMLLNETVPQWVIDITVDKN 503
ID|Chimpanzé   RVQKNGYFQVPPHTPVI FGEAGGRTLFRLLCRDSGGETESMLLNETVPQWVIDITVDKN 599
ID|Humain      RVQKNGYFQVPPHTPVI FGEAGGRTLFRLLCRDSGGETESMLLNETVPQWVIDITVDKN 558
ID|Bovin       RVQKNGYFQVPPHTPVI FGEAGGRTLFRLLCRDSGGETESMLLNETVPQWVIDITVDKN 558
ID|Souris      RVQKNGYFQVPPHTPVI FGEAGGRTLFRLLCRDSGGETEAMLLNETVPQWVIDITVDKN 544
ID|Poulet      RVQKNGYFQVPPHTPVI FGEAGGRTLFRLLCRDSGGETESMLLNETVPQWVIDITVDKN 559
ID|Poisson     RIQKNGYFQVPPHTPVI FGEAGGRTLFRLLCRDSGGETESMLLNETVPQWVIDITVDKN 558
               *:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

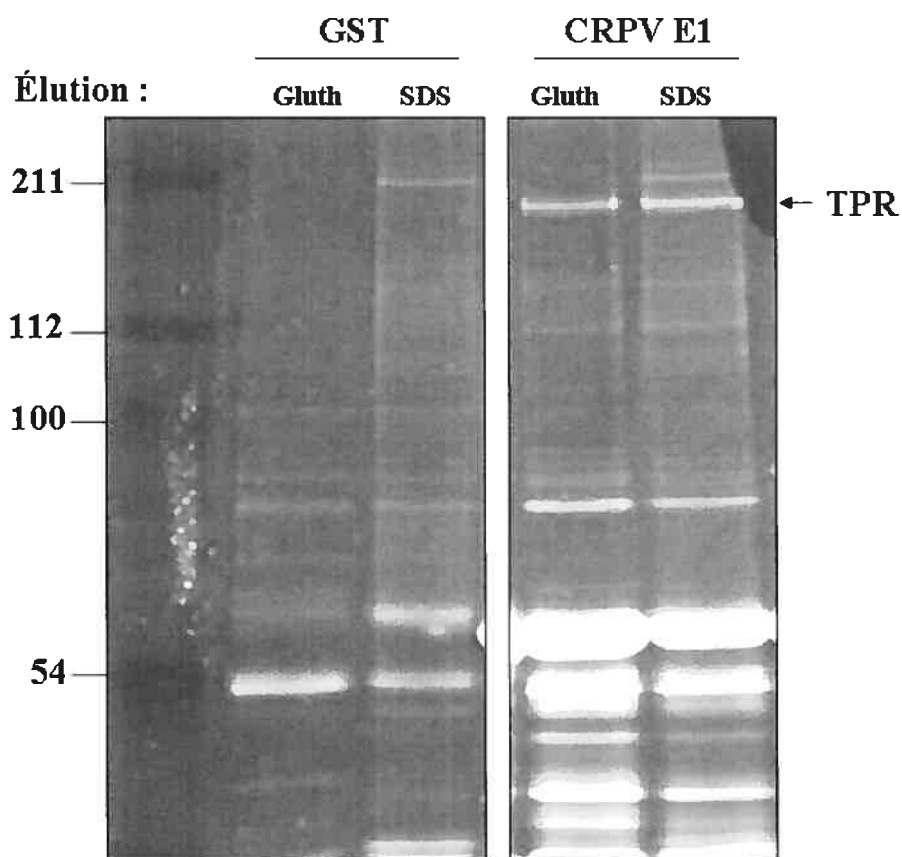
ID|Macaque      MPKFNKIPFYLQPHASSGAKTLKKDRLSASDMLQVRKVMHVYEKIINLDNESQTTSSSN 563
ID|Chimpanzé   MPKFNKIPFYLQPHASSGAKTLKKDRLSASDMLQVRKVMHVYEKIINLDNESQTTSSSN 659
ID|Humain      MPKFNKIPFYLQPHASSGAKTLKKDRLSASDMLQVRKVMHVYEKIINLDNESQTTSSSN 618
ID|Bovin       MPKFNKIPFYLQPHASSGAKTLKKDRLSASDMLQVRKVMHVYEKIINLDNESQTTSSSN 618
ID|Souris      MPKFNKIPFYLQPHASSGAKTLKKDRLSASDMLQVRKVMHVYEKIINLDNESQTTSSSN 604
ID|Poulet      MPKFNKIPFYLQPHSSGAKTLKKDRLSASDMLQVRKVMHVYEKIINLDNESQTTSSSN 619
ID|Poisson     MPKFNKIPFYLQPHSSGAKTLKKDRLSASDMLQVRKVMHVYEKIINLDNESQTTSSSA 618
               *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

ID|Macaque      NEKPGEQEKEEDIAVLAEKIELLCQDQVLDPNMDLRTVKHFIWKSGGDLTLHYRQKST 622
ID|Chimpanzé   NEKPGEQEKEEDIAVLAEKIELLCQDQVLDPNMDLRTVKHFIWKSGGDLTLHYRQKST 718
ID|Humain      NEKPGEQEKEEDIAVLAEKIELLCQDQVLDPNMDLRTVKHFIWKSGGDLTLHYRQKST 677
ID|Bovin       NEKPGEQEKEEDIAVLAEKIELLCQDQVLDPNMDLRTVKHFIWKSGGDLTLHYRQKST 677
ID|Souris      NEKP-EQEKEEDIAVLAEKIELLCQDQVLDPNMDLRTVKHFIWKSGGDLTLHYRQKST 662
ID|Poulet      NEKAGEQEKEEDIAVLAEKIELLCQDQVLDPNMDLRTVKHFIWKSGGDLTLHYRQKST 678
ID|Poisson     NDKPGEQEKEEDVSMAEKIELMCLDQVLDPNMDLRTVKHFIWKSGGDLTIHYRQKST 677
               *:*. *****:*. *****:*. *****:*****:*****:*****

```

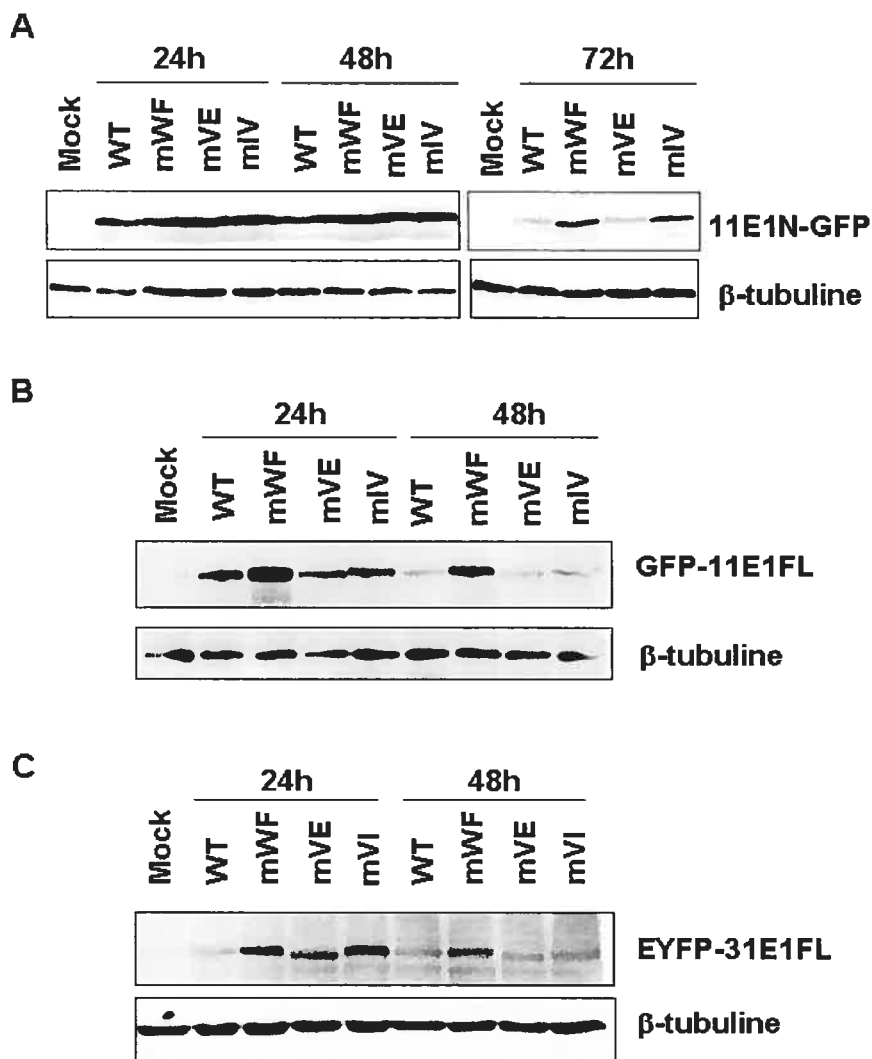
Alignement des séquences protéiques de p80 de diverses espèces animales.
 Numéros d'accès des séquences alignées à partir de la base de données
 « Protein » de NCBI: Macaque : Q4R2Z6 ; Chimpanzé : XP_516374 ; Humain :
 NP_065890 ; Bovin : NP_001069992 ; Souris : AAH48155 ; Poulet : Q5F3K4 ;
 Poisson : Q6PFM9.

ANNEXE 2



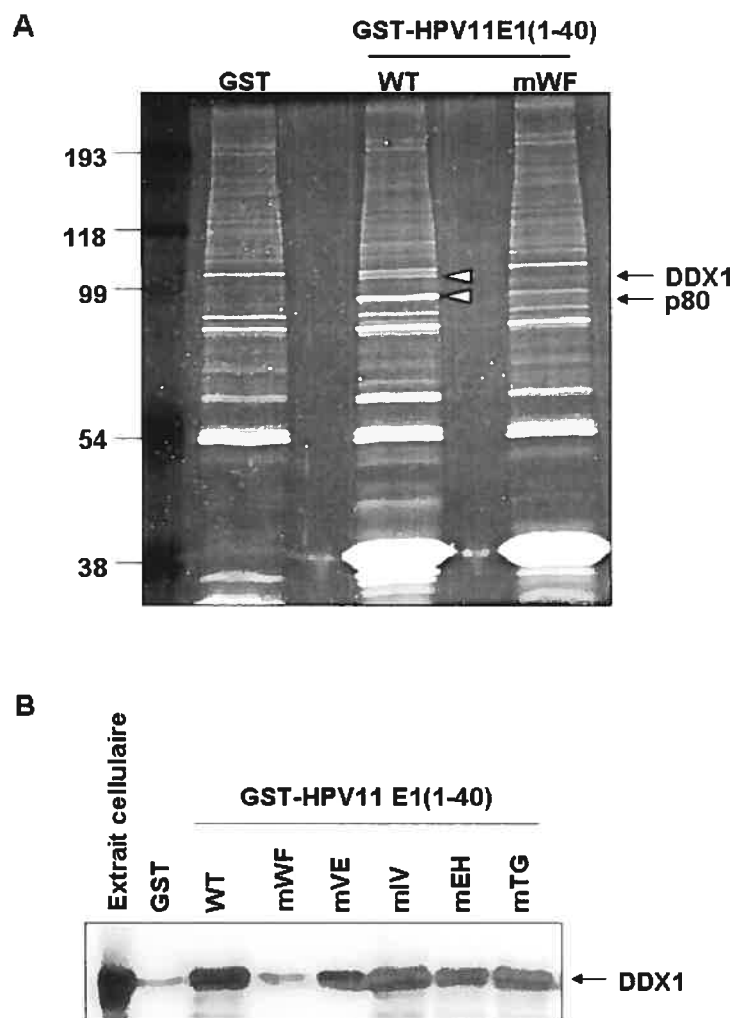
Identification de TPR en tant que partenaire potentiel de CRPV E1. Le domaine N-terminal de CRPV E1, produit en fusion avec la GST en bactéries, a été purifié par chromatographie d'affinité puis utilisé dans une expérience de « GST pulldown » tel que décrit dans la section « materials and methods ». La bande désignée sur la figure a été analysée par spectrométrie de masse et a été identifiée comme contenant la protéine TPR. TPR = « translocated promoter region » ; Gluth = glutathionne.

ANNEXE 3



Effet de l'abrogation de l'interaction entre E1 et p80 sur l'accumulation cellulaire d'E1. Les mutations (m) identifiées pour abroger la liaison de p80 ont été insérées dans les vecteurs d'expression de GFP-HPV E1. Les différentes constructions ont été transfectées dans des cellules 293, puis les cellules récoltées 24, 48 ou 72 h post-transfection pour visualiser la quantité d'E1 dans les extraits totaux par immunobavardage de type Western. La révélation à l'aide d'anticorps contre la β -tubuline est montrée comme contrôle de la quantité d'extrait chargée sur gel. Mock = cellules non transfectées, WT = « wild type » ou protéine de type sauvage

ANNEXE 4



Identification d'une interaction potentielle entre DDX1 et HPV11 E1. Les protéines fusionnées à la GST ont été produites en bactéries, purifiées par chromatographie d'affinité puis utilisées dans des essais de « GST pulldown » tel que décrit à la section « materials and methods ». A) Afin d'identifier des partenaires de p80, les protéines associées à E1 de type sauvage ont été comparées à celles purifiées à partir d'un mutant qui ne lie plus p80 (mWF). Les protéines éluées ont été séparées sur SDS-PAGE et colorées au Sypro red, puis les bandes d'intérêts excisées et analysées par spectrométrie de masse. B) Interaction de DDX1 avec les 40 premiers acides aminés de HPV11 E1 de type sauvage ou mutés pour inhiber la liaison de p80. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE puis analysées par immunobavardage de type Western à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre DDX1.

